Toxoplasmose
& Toxoplasma gondii

Wanderley de Souza
Rubens Belfort Jr.
organizadores

Toxoplasmose
& *Toxoplasma gondii*

Autores

Adriana de Melo Ferreira
Bióloga, doutora em parasitologia pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); professora do Centro Universitário de Sete Lagoas (Unifemm), Minas Gerais.

Bruno F. Fernandes
Oftalmologista, doutor em ciências visuais pela Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM/Unifesp); pesquisador sênior do Instituto Vegter, Montreal, Canadá.

Celso F. H. Granato
Médico-infectologista, patologista clínico, doutor em infectologia pela Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM/Unifesp); livre-docente de infectologia da EPM/Unifesp.

Cláudio Silveira
Oftalmologista, doutor em medicina pela Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM/Unifesp); diretor da Clínica Silveira, membro do International Uveitis Study Group (Iusg).

Cléa Carneiro Bichara
Médica, doutora em biologia de agentes infecciosos e parasitários pela Universidade Federal do Pará (Ufpa); professora adjunta do Departamento de Medicina Comunitária da Universidade do Estado do Pará (Uepa) e do Programa de Pós-Graduação do Núcleo de Medicina Tropical da Ufpa.

Cristina Muccioli
Oftalmologista, doutora em oftalmologia pela Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM/Unifesp); pesquisadora bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), professora adjunta e livre-docente do Departamento de Oftalmologia da EPM/Unifesp.

Eleonor Gastal Lago
Médica, doutora em pediatria pela Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS); professora adjunta da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Érica dos Santos Martins-Duarte
Farmacêutica, doutora em ciências (biofísica) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ); bolsista de pós-doutoramento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IBCCF/UFRJ).

Esper Georges Kallás
Médico-infectologista, doutor em infectologia pela Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM/Unifesp); livre-docente e professor associado da disciplina de imunologia clínica e alergia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Gláucia Manzan Queiroz de Andrade
Médica, doutora em ciências da saúde (saúde da criança e do adolescente) pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); professora adjunta do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFMG.

Guido Carlos Levi
Médico-infectologista, doutor em ciências médicas pela Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM/Unicamp); vice-presidente da Sociedade Brasileira de Imunizações (SBIm) e membro do Comitê Técnico Assessor em Imunizações do Programa Nacional de Imunizações (PNI) do Ministério da Saúde.

Helene Santos Barbosa
Bióloga, doutora em biologia celular e molecular pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz); pesquisadora titular do Laboratório de Biologia Estrutural do Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), pesquisadora do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Inarei José Paulini Junior
Biólogo, mestre em biociências e biotecnologia pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Uenf), doutorando em infectologia pela Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM/Unifesp).

Jeffrey L. Jones
M.D., M.P.H. Parasitic Diseases Branch, Division of Parasitic Diseases and Malaria, Center for Global Health Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Estados Unidos.

Jitender P. Dubey
Animal Parasitic Diseases Laboratory, Beltsville Agricultural Research Center, United States Department of Agriculture, Beltsville, Estados Unidos.

João Silva de Mendonça
Médico-infectologista, doutor em ciências médicas pela Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM/Unicamp); diretor do serviço de moléstias infecciosas do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo (HPESP).

Joseli Lannes-Vieira
Bióloga, doutora em ciências (imunologia) pelo Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IBCCF/UFRJ); pesquisadora em saúde pública do Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz).

Márcia Attias
Bióloga, doutora em ciências biológicas (biofísica) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ); professora associada da UFRJ e pesquisadora do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj).

Marcos de Assis Moura
Médico-veterinário, doutor em biologia parasitária pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz); pesquisador visitante do Laboratório de Biologia Estrutural do Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz).

Miguel N. Burnier Jr.
Médico, doutor em medicina (oftalmologia) pela Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM/Unifesp); professor titular de Oftalmologia e Patologia, diretor do Laboratório Henry C. Witelson de Patologia Ocular; catedrático em oftalmologia da Universidade McGill, Montreal, Canadá.

Renata Morley de Muno
Médica-veterinária, mestre em biologia celular e molecular pelo Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), doutoranda do Laboratório de Biologia Estrutural do IOC/Fiocruz.

Ricardo Wagner de Almeida Vitor
Farmacêutico-bioquímico, doutor em parasitologia pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); professor associado do Instituto de Ciências Biológicas do Departamento de Parasitologia da UFMG.

Rossiane Claudia Vommaro
Bióloga, doutora em ciências biológicas (biofísica) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ); professora associada da UFRJ e pesquisadora do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Rubens Belfort Jr. (organizador)
Médico, doutor em microbiologia e imunologia pela Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM/Unifesp); professor titular do Departamento de Oftalmologia da EPM/Unifesp, membro titular da Academia Brasileira de Ciências, membro titular da Academia Nacional de Medicina e presidente da Academia Brasileira de Oftalmologia.

Saul Cypel
Médico, neuropediatra, doutor em neurologia pela Universidade de São Paulo (USP); livre-docente da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), membro do Comitê de Especialistas e de Mobilização Social do Ministério da Saúde para o Desenvolvimento Integral da Primeira Infância.

Vivian Iida Avelino-Silva
Médica-infectologista, doutoranda do Programa de Pós-Graduação do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Wanderley de Souza (organizador)
Médico, doutor em ciências biológicas (biofísica) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ); professor titular do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF) da UFRJ, diretor de Metrologia Aplicada às Ciências da Vida (Dimav) do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro).

Sumário

Prefácio

Recebi de Wanderley de Souza e Rubens Belfort Junior solicitação para elaborar um texto sobre a história da toxoplasmose humana, para fazer parte deste livro. Não pude deixar de aceitar o encargo por dois motivos essenciais: é impossível negar colaboração a esses dois ilustres profissionais e, também, porque em virtude de circunstâncias participei pessoalmente da fase na qual teve início a constatação da importância desta modalidade de protozoose.

Em 1950, quando era aluno de graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, frequentei um laboratório do Instituto Biológico de São Paulo, dirigido por Paulo Nóbrega. Nele também exercia atividade José Reis, que, além de emérito pesquisador, foi incansável estimulador da divulgação científica no Brasil. Nesse ambiente, notei a intenção de estimular estudos para verificar a importância da infecção por *Toxoplasma gondii* em seres humanos.

Com inteira justiça, é preciso lembrar que diversos pesquisadores nacionais, ou radicados no Brasil, desempenharam significativo papel nas diferentes fases dos estudos relacionados à toxoplasmose. Esses profissionais não apenas contribuíram com noções essenciais à natureza de *T. gondii*, mas também desenvolveram estudos de natureza clínica, diagnóstica e terapêutica. Entre eles, destaco Biócca, Carini, Delascio, Fialho, Nóbrega, Reis, Splendore e Torres. Como exemplos, destaco Nóbrega e Reis, que afirmaram haver uma só espécie, *T. gondii*, e não outras rotuladas conforme os animais dos quais foram obtidas. Delascio confirmou, em 282 oportunidades, a forma congênita. Fialho ajudou ativamente a reconhecer a modalidade ocular da doença. Como feito marcante, é indispensável citar que o protozoário foi identificado pela primeira vez, no coelho, por Splendore. Essa citação obriga a rememorar a divergência no campo da nomenclatura biológica, pois Nicolle e Manceaux posteriormente observaram o protozoário no *gundi*, um roedor africano. Prevaleceu erradamente, à época, a designação *T. gondii* e não *T. cuniculi*, de Splendore. Ao relatar esses fatos, quero acentuar que todos eles foram pioneiros, em momentos em que a toxoplasmose ainda não atingira grandes dimensões e importância.

Em seguida, chegamos à fase na qual pesquisadores anteviam a expressividade da infecção por *T. gondii* do ponto de vista médico-assistencial. Agora, repercussões da parasitose encontram-se sobejamente delineadas, refletindo um panorama de inegável importância e concedendo razão aos que admitem, por convicções advindas de motivos de várias ordens, potencialidade a ela.

Há pouco mais de cinquenta anos era patente o caráter de ser a toxoplasmose uma doença nova. Depois, graças ao labor de vários cientistas, ficou evidente que essa protozoose é muito comum e, felizmente, benigna, só eventualmente assumindo feição de enfermidade grave. O tipo de evolução, de maior ou menor intensidade, estaria relacionado com o sistema imunitário.

Sabin foi o cientista que idealizou a vacina oral para prevenir a poliomielite, com a colaboração do pediatra norte-americano Feldman. Na área da toxoplasmose, o trabalho de ambos foi fundamental para o desenvolvimento de um recurso prático para o diagnóstico. Estabeleceu-se assim o teste do corante, como ficou conhecido. O método em questão afigurou-se excelente recurso para o crescimento dos estudos concernentes à toxoplasmose. De execução lenta e muito trabalhosa, a prova foi paulatinamente substituída por outras. Não obstante, exerceu marcante papel na história da parasitose.

De 1923 a 1943, surgiram vários relatos de infecção toxoplásmica humana por Torres e Nery Guimarães – no Brasil –, além dos de Janku, Wolf e Cowen, Pinkerton e Weinman. Torres considerou o *Encephalitozoon* o agente da afecção por ele observada, e deu à espécie a designação *E. chagasi*. Depois, desfeita a compreensível confusão, foi possível perceber que a comunicação correspondeu a uma das primeiras indicações da toxoplasmose humana. É interessante ainda mencionar que o primeiro doente adulto com a infecção foi reconhecido por Pinkerton e Weinman. Posteriormente, muitas notificações mostraram múltiplos aspectos da moléstia, transmitiram observações sobre outros casos e, sobretudo, destacaram os problemas congênitos e oculares motivados por *T. gondii*.

Gard e Magnusson, em 1950, e subsequentemente Siim – num estágio digno de especial alusão –, verificaram que a toxoplasmose pode ser confundida com a mononucleose infecciosa, já que ambas apresentam aspectos clínicos e hematológicos semelhantes.

Com base no trabalho médico-assistencial cotidiano, recolhi elementos para especificar as diferentes configurações da toxoplasmose humana pós-natal. O elenco, quando relatado em evento científico internacional, foi aprovado e elogiado por Remington, pesquisador com notoriedade no âmbito da doença. São elas: assintomática; oligossintomática; ganglionar, também citada como glandular ou linfoglandular e parecida com a mononucleose infecciosa; ocular, como uveíte posterior e nem sempre sendo recrudescimento da forma congênita; cardíaca, como miocardite aguda e sem potencial evolutivo para a cronicidade; pulmonar, como pneumonia intersticial; hepática, como hepatite aguda e sem potencial para cronicidade; meningoencefálica, com predomínio de célula linfomonocitária; exantemática; reumática, mas parecendo ser constituída por distúrbio articular paralelo; mista, generalizada, associada à imunodepressão ou imunossupressão, como na Aids.

A quantidade de casos graves aumentou porque se tornou bem mais frequente a imunodepressão, por diversos motivos, e a Aids contribui com esse panorama, revelando até lesões incomuns, como as encefálicas.

A toxoplasmose pós-natal, de acordo com o que sistematizei, engloba várias configurações clínicas. Uma delas é a denominada ganglionar, também conhecida como glandular ou linfoglandular. É a mais comumente diagnosticada, porquanto não requer, por vezes, trabalhosa e complicada diferenciação com outras moléstias. Figura nos grupos da doença mononucleose símile, havendo certas semelhanças com essa virose; e o hemograma é orientador que facilmente comparece, e nele se observa uma razoável porcentagem de linfócitos atípicos. Com base em casuística de bom porte, aprofundei-me no assunto, classificando em porcentagem os diagnósticos elucidados. Essas modalidades da infecção pelo *T. gondii* situaram-se em segundo lugar, ocupando o primeiro a mononucleose. Portanto, quando o exame hematológico revela a alteração linfocitária citada, é cabível cogitar que o mal tem nexo com a parasitose. Documentei o fato e, com base nisso, hoje a conduta se tornou rotina.

A confirmação laboratorial da infecção desempenhou indiscutível papel no seu reconhecimento e permitiu desvendar os tipos clínicos da toxoplasmose doença.

Prova intradérmica chegou a ser empregada para o diagnóstico. Todavia, está fora de cogitação agora, mormente por não separar infecção de doença. Paulo Nóbrega, precocemente, idealizou reação de fixação de complemento e

figura como colaborador na publicação pertinente. Julgou-se que revelaria atividade, mas isso ficou descartado. A prova de Sabin-Feldman foi responsável por expressivo impulso e, entre outros méritos, destaco o informativo número de inquéritos epidemiológicos realizados, ao lado de dados clínicos para elucidar a causa de variados tipos de agravos. Conforme idade, sexo, hábitos e lugares, as porcentagens de positividade surgiram, sendo algumas bastante elevadas. O exame, para alguns, não contaria com especificidade confiável, o que logo recebeu constatação, pois, na verdade, verificou-se intensa amplitude da infecção, realisticamente demonstrada. Determinada pessoa, por outro lado, destacou esse inconveniente e sofreu total desmentido, valendo frisar que injetava elevadas quantidades de diversos protozoários em coelhos, o que não sucede em avaliações habituais. Os trabalhos de Mário Camargo, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, facilitaram muito, por meio de provas sorológicas, o estabelecimento do diagnóstico e a demarcação de etapa na evolução da infecção. Camargo usou testes de hemaglutinação, imunofluorescência e Elisa, sempre com verificação de anticorpos do tipo IgM. Separou os períodos da infecção em agudo, de transição e crônico.

Tarefas assistenciais tornaram-se simplificadas e ficou mais seguro orientar gestantes a respeito da eventual transmissão congênita. A título de comparação: o teste Sabin-Feldman demarcava positivamente quando atingia até 1/1.000; se chegasse a 1/4.000 admitia-se que o processo estava em fase aguda e, assim, distinguia-se infecção de doença. Convenhamos que a interpretação, ocasionalmente, continha alguma insegurança.

Somaram-se aos meios laboratoriais que permitem determinações precisas pertinentes à toxoplasmose a reação da polimerase em cadeia (PCR) e a prova demonstrativa da avidez de anticorpos. A primeira comprova a existência do protozoário, sem revelar sua agudicidade ou não; a segunda mostra a duração do processo parasitário, servindo para a obtenção de várias informações. Além disso, facilita a orientação na atenção médica a mulheres grávidas, sendo assim um auxílio proveitoso em situações suscitadoras de embaraços. É fácil perceber que esses dois recursos representam claros progressos, aos quais adiciono a técnica imuno-histoquímica que distingue *T. gondii* de microrganismos parecidos com ele.

Posteriormente às demonstrações de que *T. gondii* causava comprometimentos em seres humanos, cresceu o interesse em saber como eram as possíveis configurações clínico-patológicas. Relatos pertinentes tornam-se aos poucos mais numerosos, com apoio de procedimentos auxiliares destinados a definir diagnósticos cada vez mais prestimosos. Paralelamente, delineou-se a necessidade de encontrar tratamentos eficazes. Presenciei essa fase e nesse início cheguei a usar tetraciclina. Aos poucos houve preconização de outros recursos terapêuticos, por vezes com informações não respeitáveis por não levarem em conta critérios indispensáveis.

Atualmente, determinados medicamentos são os mais utilizados para o tratamento da toxoplasmose humana. Cito os seguintes: sulfadiazina associada a pirimetamina, com sinergismo entre os dois fármacos e convicção de que compõem a melhor conduta terapêutica; sulfametoxazol associado a trimetoprima; espiramicina, preferível durante a gravidez, podendo reduzir a transmissão congênita sem alterar o panorama clínico; e clindamicina.

A imunodepressão pode levar a infecções mais graves e pessoas com esse distúrbio merecem atenção especial, surgindo a toxoplasmose como infecção ou reativação parasitária. Logicamente o tratamento ganhou novo e intenso percalço, e infecções desse tipo são tratadas principalmente com sulfadiazina-pirimetamina e sulfametoxazol associado a trimetoprima, prescrito igualmente para conter recaídas. Na Aids, com mais um contratempo, alergia a sulfa ocorre com razoável frequência. Em crianças com enfermidade congênita, é cabível que o processo tenha feição subclínica. Recomenda-se tratá-las, para evitar problemas posteriores.

Corticoide ocasionalmente compõe o tratamento. Ajuda a conter a inflamação por taquizoítas. Drogas antitoxoplasma, se administradas conjuntamente, debelam as alterações e evitam ou diminuem o aparecimento de sequelas.

Quando os prejuízos já estão estabilizados alguns profissionais indicam continuar o tratamento, o que se justifica, por exemplo, na presença de lesões cerebrais ou oculares.

Ainda a respeito do tratamento, saliento que infectados, com frequência, evoluem de maneira autolimitada, e não há consenso acerca da conveniência de medicá-los. Acrescento que os compostos hoje utilizados não negativam as provas sorológicas, nem influem nos anticorpos IgM antitoxoplasma. Repito: pelo menos com o que contamos agora.

Fazendo-se uma revisão da literatura médica a respeito da toxoplasmose, podem-se distinguir quatro etapas na evolução dos conhecimentos sobre o tema: descoberta do agente etiológico; descrição no homem; emprego de reações sorológicas para o diagnóstico; identificação do hospedeiro definitivo.

Primeira etapa (a descoberta do agente etiológico) – inicia-se em 1908, com a descoberta do parasita por Splendore, em São Paulo, que registrou, em laboratório, a morte de coelhos infectados pelo microrganismo. Segue-se, no mesmo ano, o encontro do protozoário no *gundi*, roedor africano também utilizado em laboratório por Nicolle e Manceaux, em Túnis, na Tunísia.

A descoberta, quase concomitantemente, do parasita em dois continentes e em duas espécies de animais, fazia antever, de certa forma, a ampla distribuição geográfica do novo protozoário descrito. Já nos anos seguintes surgiram os primeiros relatos da detecção do protozoário em diversos mamíferos e aves naturalmente infectados: em 1911, no cão, por Mello e Carini, e no pombo, por Carini; em 1913, no camundongo, por Sangiorgi; em 1916, na cobaia, por Carini e Migliano. Atualmente é bastante extensa a relação de espécies entre mamíferos e aves encontradas naturalmente infectadas por *T. gondii*, incluindo animais domésticos, de criação, peridomiciliares e mesmo de vida selvagem livre ou mantidos em cativeiro. Muito embora a observação, na maioria das vezes, tenha sido feita em eventos isolados, já foram descritas epizootias em coelhos, pombos, galinhas, cães de baixa idade e carneiros.

A segunda etapa (descrição da toxoplasmose no homem) – os estudos sobre a toxoplasmose, até então relacionada unicamente a animais, passaram a despertar grande interesse com a descrição dos primeiros comprometimentos humanos.

Em 1923, Janku relatou o caso de uma criança falecida em Praga, com 11 meses de idade. Ela apresentava hidrocefalia e cegueira, e na necropsia, em cortes do globo ocular direito, ficaram evidenciados parasitas semelhantes ao toxoplasma. Segundo o autor referido, tratava-se de infecção de origem congênita.

Torres, em 1927, no Rio de Janeiro, descreveu a presença de microrganismos, que identificou como *T. gondii* ou *Encephalitozoon*, em cortes histológicos de cérebro, miocárdio e músculo esquelético de um recém-nascido falecido no 29º dia de vida. Houve também menção à possibilidade de corresponder essa comprovação a uma afecção congênita.

Em 1937, Wolf e Cowen descreveram a ocorrência de toxoplasmose fatal em um recém-nascido com encefalite, meningite e mielite. Depois, Wolf e colaboradores, em 1939, comunicaram a existência de toxoplasma em uma lesão do sistema nervoso central de uma criança falecida com um mês de vida.

Logo após, Pinkerton e Weinman, em 1940, e Pinkerton e Henderson, em 1942, nos Estados Unidos, registraram a ocorrência da toxoplasmose em adultos, com isolamento do parasita.

Terceira etapa (introdução de técnicas sorológicas para o diagnóstico da toxoplasmose) – a implementação do teste do corante (*dye test*) por Sabin e Feldman representou importante contribuição para o diagnóstico laboratorial da toxoplasmose e possibilitou, paralelamente, realização de investigações epidemiológicas. A seguir, propuseram-se várias outras reações, entre as quais merecem destaque, por serem mais frequentemente empregadas, a hemaglutinação,

por Jacobs e Lund, a imunofluorescência indireta, por Kelen e colaboradores, e a fixação do complemento, por Nicolau e Revelo e por Warren e Sabin. Frenkel, em 1948, inseriu no contexto de prova de reconhecimento da parasitose o teste da sensibilidade cutânea à toxoplasmose.

Com o uso de exames sorológicos, ficou demonstrada a presença de anticorpos contra *T. gondii* em grande número de habitantes de diferentes áreas geográficas, bem como em numerosas espécies de animais. De tal forma está disseminada a infecção por *T. gondii*, que pode ser considerada inteiramente válida a afirmativa feita por Jacobs de que "vivemos num mar de infecção toxoplásmica".

Quarta etapa (identificação do hospedeiro definitivo) – nesta fase sucedeu a descoberta do hospedeiro definitivo do *T. gondii*, ou seja, o gato, permitindo melhor conhecimento da epidemiologia da toxoplasmose. Outros felídeos, convém destacar, também atuam como hospedeiro definitivo.

Os estudos que levaram à identificação do hospedeiro definitivo tiveram início com a detecção, por Hutchison, de uma forma infectante e resistente do toxoplasma em fezes de gato. Posteriormente, graças aos trabalhos de vários pesquisadores – como Hutchison, na Dinamarca; Frenkel, Jacobs, Dubey e Miller, nos Estados Unidos; e Piekarski e Wite, na Alemanha –, ficou demonstrado o ciclo sexuado de *T. gondii* no intestino desse felídeo.

Por fim, ouso apontar sugestões quiçá valiosas que, se concretizadas, conduzirão ao prosseguimento do processo de aquisição de mais alguns subsídios para abordarmos construtivamente singularidades atinentes à toxoplasmose. Ei-las: programar sorologicamente conhecer mulheres ainda não infectadas, possibilitando recomendações de caráter preventivo; procurar drogas efetivas para tratamento com esquemas de curta duração e sem toxicidade; produzir drogas que atinjam os cistos, com o objetivo de suprimir a parasitose e evitar recaídas ou reativações; pesquisar para saber se cepas influem quanto às feições clínico-patológicas; investigar a provável transmissão de *T. gondii* por transfusão de sangue; e por fim, a consecução de um fabuloso sonho, ou seja, a obtenção de vacina preventiva bem respaldada cientificamente, sendo conveniente lembrar que se encontram em curso, com este objetivo, esforços diversificados.

Esta é minha simplória colaboração. Wanderley e Rubens: não esmoreçam e persistam contribuindo com brilho para a medicina brasileira.

Vicente Amato Neto
Professor emérito da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP);
ex-chefe do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da mesma universidade

Apresentação

Certamente a descrição do que hoje conhecemos como *Toxoplasma gondii*, agente etiológico de uma das doenças causadas por protozoários de elevada importância por sua distribuição em todo o mundo, constitui momento expressivo da ciência brasileira. Os capítulos subsequentes, abordando tanto aspectos básicos da biologia de *T. gondii* como a epidemiologia da protozoose por ele causada e os aspectos clínicos e terapêuticos das várias manifestações da toxoplasmose, deixarão claro o grande valor do alcance deste estudo. Nesta Apresentação, procuraremos enfatizar alguns aspectos relevantes para que se tenha uma perspectiva histórica da magnitude da descoberta.

Inicialmente, devemos considerar o estágio da protozoologia médica no fim do século XIX e início do século XX. É um período rico, em que pesquisadores lançaram mão da microscopia óptica para observar todos os tecidos de diferentes animais apresentando sinais e sintomas de doenças. Em 1859, Lambl descreveu *Giardia lamblia*, que já havia sido observado muito antes por Leeuwenhoek. Em 1875, Losch descreveu *Entamoeba histolytica*. Em 1885, Cunningham fez as primeiras observações com organismos hoje pertencentes ao gênero *Leishmania*. Donovan e Ross avançaram nesses estudos e Ross, em 1903, descreveu a *Leishmania donovani* (Laveran e Mesnil, 1903), abrindo caminho para a descrição de outras espécies como *Leishmania infantum*, por Nicolle em 1908, e *Leishmania braziliensis*, por Vianna em 1911. Em 1902, Dutton abriu a fase de descrição de protozoários do gênero *Trypanosoma*, descrevendo o *Trypanosoma gambiensi* em 1902, sendo seguido pela descrição de *T. cruzi* por Chagas em 1909 e *T. rangeli* por Tejera em 1920. No campo dos organismos que hoje agrupamos como Apicomplexa, temos a primeira descrição do *Plasmodium malariae* por Laveran em 1881, seguido das descrições de *Plasmodium vivax* por Grassi e Feletti em 1890, de *Plasmodium falciparum* por Welch em 1897, e de *Plasmodium ovale* por Stephens em 1922.

Tais informações são essenciais para esclarecer que o período de 1875 a 1910 foi caracterizado pela descrição dos mais importantes protozoários causadores de doenças no homem.

A descoberta de *Toxoplasma gondii* foi realizada simultaneamente no Brasil, por Alfonso Splendore (1871-1953), e em Túnis, por Charles Nicolle (1866-1936) e Louis Manceaux (1865-1934) em 1908. Para alguns historiadores é também importante registrar o trabalho de Samuel Darling (1872-1925), que observou a presença de protozoários em biópsia de músculo humano, sugerindo que se tratava de *Sarcosporidia* (Darling, 1909). No Brasil, Splendore, pesquisador de origem italiana que atuava como diretor do Laboratório Bacteriológico do Hospital Português de São Paulo, examinou alguns coelhos que apresentavam um quadro infeccioso agudo e que levava à morte dos animais. O exame microscópico de diferentes tecidos e órgãos mostrou a presença do que ele chamou de *speciali corpuscoli*. O corpúsculo apresentava um comprimento de 5-8 micrômetros e uma largura de 2,5-4 micrômetros. Como não se enquadrava em nada que ele conhecia, resolveu enviar o material para ser observado pelo grande protozoologista Prowazek, que naquele momento estava trabalhando no Instituto de Manguinhos (atual Instituto Oswaldo Cruz),

no Rio de Janeiro. Esse pesquisador tampouco identificou a natureza dos corpúsculos e sugeriu que deveria tratar-se de um novo organismo. Com base em tais informações, Splendore publicou uma comunicação na *Revista da Sociedade Scientifica de São Paulo*, n. 10-12, de 1908. No mesmo ano, Nicolle e Manceaux, trabalhando em Túnis, identificaram organismos semelhantes em um roedor do norte da África, chamado *gundi*. Na primeira descrição, publicada no volume 147 de *Compte Rendu de l'Académie des Sciences de Paris*, os organismos visualizados foram descritos como corpos de Leishman. Aqui cabe lembrar que, no mesmo ano, Nicolle descreveu *L. infantum* em pacientes da região do Mediterrâneo. Em 1909, tanto Splendore como Nicolle e Manceaux publicaram novos artigos reforçando a ideia de que estavam descrevendo um novo protozoário, e o grupo francês sugeriu a existência do gênero *Toxoplasma* (designação formada do grego *toxon* = arco e *plasma* = corpo), com as espécies *T. gondii* (que parece ter resultado de um erro de grafia, substituindo um 'u' por um 'o' do roedor em que foi encontrado o protozoário, o *Ctenodactylus gundi*) e *T. cuniculi* (encontrado no coelho). Com as subsequentes demonstrações de que se tratava de uma única espécie, prevaleceu a designação *Toxoplasma gondii* (Splendore, 1909; Nicolle & Manceaux, 1908).

Durante muito tempo houve certa discussão sobre quem deveria ter o mérito principal pela descrição. Hoje, há consenso em reconhecer o mérito dos dois grupos. Um marcante reconhecimento do mérito da descoberta brasileira foi a decisão de comemorar o centenário da descoberta de *T. gondii* em um simpósio internacional, realizado em setembro de 2008, na cidade de Búzios, Rio de Janeiro, que contou com ampla participação de pesquisadores da França e da Tunísia.

É importante ressaltar que Splendore também realizou relevantes estudos que levaram à descrição do fungo *Zimomena brasiliensis*, hoje conhecido como *Paracoccidioides brasiliensis*, agente etiológico da blastomicose sul-americana. Em 1912, Splendore retornou à Itália, onde trabalhou por oito anos como professor de bacteriologia das universidades de Roma e de Parma. Retornou ao Brasil em 1924, e tudo indica que se encontrou com Charles Nicolle durante sua visita ao Brasil em 1925, a convite de Carlos Chagas. Em 1928, Nicolle recebeu o prêmio Nobel de Medicina, sobretudo por seu trabalho com a epidemia de tifo.

Cabe ainda registrar que a posição taxonômica de *T. gondii* permaneceu por muito tempo indefinida. Em seguida à descrição do protozoário, houve uma fase em que predominou a publicação de artigos descrevendo sua presença nos mais variados tipos de animais, demonstrando, assim, sua ampla distribuição.

Nesta apresentação, decidimos tratar apenas dos fatos mais relevantes ocorridos nos primeiros cinquenta anos da descoberta. Os avanços posteriores certamente estarão incorporados aos demais capítulos que compõem este livro.

Um destaque especial deve ser dado ao trabalho de 1927 publicado por Magarinos Torres (1927), brilhante patologista da Escola de Manguinhos que descreveu a existência de uma forma congênita da toxoplasmose, o que foi confirmado e ampliado por Wolf, Cowen e Paige (1939). Em 1937, Albert Sabin e Peter Olitsky deram importante contribuição ao utilizarem uma abordagem semelhante à que se empregava com os vírus para manter *T. gondii* em animais (Sabin & Olitsky, 1937). Esses autores apontaram que: era possível transferir os protozoários por inoculação subcutânea, intraperitoneal e intracranial usando diferentes tecidos de animais infectados; diferentes isolados mostravam variação na virulência da infecção e que esta se acentuava à medida que o protozoário era transferido de animal para animal; a infecção poderia ocorrer quando um animal normal comia um animal infectado. Durante tais estudos ficou evidente que *T. gondii* era um protozoário de vida intracelular. Ainda em 1937, Wolf e Cowen mostraram que uma criança que havia morrido com um quadro grave de encefalomielite apresentava parasitas no tecido cerebral, associados com lesões necróticas e granulomatosas, e que esses parasitas infectavam animais inoculados. Em 1942, Felipe Nery Guimarães e Hertha Meyer, trabalhando no Instituto Oswaldo Cruz e no Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, mostraram que é possível manter *T. gondii* em cultura de células,

abrindo caminho para centenas de trabalhos que utilizam esse método para manter o protozoário (Guimarães & Meyer, 1942). Cabe ainda destacar um conjunto de trabalhos importantes realizados na década de 1950, em que ficou claro o relevante papel de *T. gondii* na geração de lesões oculares que serão discutidas nesta obra.

Os organizadores

REFERÊNCIAS

DARLING, S. *T. Sarcosporidiosis*: with report of a case in man. *Proceedings of the Canal Zone Medical Association*, 1: 141-152, 1909.

GUIMARÃES, F. N. & MEYER, H. Cultivo de *Toxoplasma* Nicolle & Manceaux, 1909, em cultura de tecidos. *Revista Brasileira de Biologia*, 2: 123-129, 1942.

NICOLLE, C. & MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 148: 369-372, 1909.

NICOLLE, C. & MANCEAUX, L. Sur une infection a corps de Leishman (ou organims voisins) du gondii. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 147: 763-766, 1908.

SABIN, A. Toxoplasmosis, a recently recognized disease of human beings. *Advances in Pediatrics*, 1: 1-60, 1942.

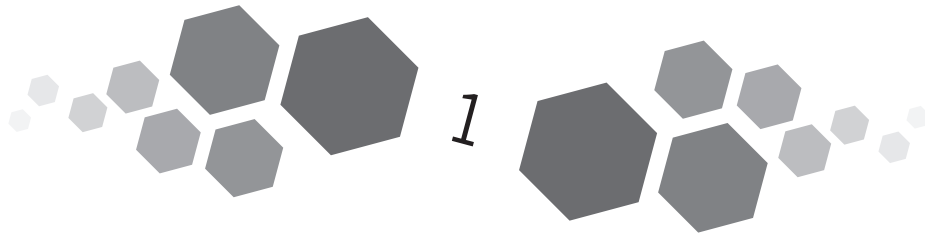
SABIN, A. & OLITSKY, P. K. Toxoplasma and obligate intracellular parasitism. *Science*, 85: 336-338, 1937.

SPLENDORE, A. Um nuevo protozoa parassita dei conigli incontrato nelle lesioni anatomiche duna malattia che ricroda in molti ponti il kala-azr delluomo. *Revista da Sociedade Scientífica de São Paulo*, 3: 109-112, 1908.

SPLENDORE, A. Sopra um nuovo protozoo parasita dei conigli. *Revista da Sociedade Scientífica de São Paulo*, 4: 75-79, 1909.

TORRES, C. M. Sur uns nouvelle maladie de l'homme, characterisée par la presence dún parasite intracellulaire, trés proche du *Toxoplasme* et de l'encephalitozoon dans le tissu musculaire cardiaque, les muscle du squelette, le tissu sous-cutané et le tissu nerveux. *Comptes Rendue de la Société de Biologie*, 97: 1.778-1.779, 1927.

WOLF, A. & COWEN, D. Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon (encephalitozic ancephalomyelitis): a new protozoan disease of man. *Bulletin of the Neurological Institute of NewYork*, 6 : 306-335, 1937.

WOLF, A.; COWEN, D. & PAIGE, B. Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. *Science*, 89: 226-227, 1939.

Aspectos Taxonômicos e Evolutivos

Adriana de Melo Ferreira • Ricardo Wagner de Almeida Vitor

TAXONOMIA DE *TOXOPLASMA GONDII*

Toxoplasma gondii é um protozoário parasita intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, classe Conoidasida N. Cl., subclasse Cocciidia, ordem Eucoccidiida, família Sarcocystidae e subfamília Toxoplasmatinae (Levine, 1988). Todos os membros dessa subfamília apresentam ciclo heteróxeno e oocisto do tipo *Isospora*, isto é, com dois esporocistos e com quatro esporozoítas no interior de cada esporocisto. Dentro da subfamília Toxoplasmatinae, além do gênero *Toxoplasma*, ainda estão incluídas outras espécies como *Neospora caninum*, agente abortivo em bovinos, de distribuição mundial e cujo hospedeiro definitivo é o cão; *Besnoitia besnoiti*, agente causador da besnoitiose bovina, doença responsável por perdas significativas na África e Mediterrâneo devido a alta mortalidade, abortos e infertilidade em machos, e *Hammondia hammondi*, protozoário relacionado a *T. gondii* e que também utiliza os felídeos como hospedeiros definitivos, mas que ainda não foi responsabilizado por sintomas clínicos em hospedeiros intermediários.

O gênero *Toxoplasma* foi criado por Nicolle e Manceaux em 1909 ao observarem um novo protozoário, ainda não descrito, causando uma infecção disseminada e fatal em roedores africanos denominados *gundi*. O termo *Toxoplasma* (do grego *toxon* = arco e *plasma* = corpo) foi usado pelos seus descobridores pelo fato de apresentar morfologia crescente. No mesmo ano, Splendore identificou o novo protozoário em coelhos no Brasil.

Existe apenas uma espécie de *Toxoplasma, T. gondii* (Dubey, 2010). Entretanto, Levine (1988) considera a existência de outras oito espécies do gênero *Toxoplasma*: *T. alencari* na rã *Leptodactylus ocellatus*; *T. bahiensis* (syn. *Isospora bigemina*, *Hammondia heydorni*) em canídeos (hospedeiros definitivos) e ruminantes (hospedeiros intermediários); *T. brumpti* na iguana *Iguana tuberculata*; *T. colubri* na serpente *Coluber viridiflavus*; *T. hammondi* (syn. *Hammondia hammondi*) em felídeos (hospedeiros definitivos) e roedores (hospedeiros intermediários); *T. pardalis* (syn. *Hammondia pardalis*) em felídeos (hospedeiros definitivos) e roedores (hospedeiros intermediários); *T. renae* na rã-leopardo *Rana pipiens* e *T. serpai* no sapo *Bufo marinus*. A existência dessas espécies, contudo, ainda necessita de confirmação.

ASPECTOS EVOLUTIVOS DA BIOLOGIA DE *TOXOPLASMA GONDII*

O ciclo de vida heteróxeno (isto é, de dois hospedeiros) de coccídios formadores de cistos envolve tipicamente o ciclo obrigatório entre o hospedeiro definitivo (fase sexuada) e o intermediário (fase assexuada), e a ingestão acidental de cistos teciduais por um hospedeiro impróprio (não definitivo) geralmente inviabiliza a transmissão do parasita. *T. gondii* rompeu essa barreira ao longo da evolução, de forma que a ingestão de cistos teciduais entre hospedeiros intermediários de hábitos carnívoros e saprofágicos pode ser realizada eficientemente, o que permite que o ciclo infeccioso se complete assexuadamente, ou seja, sem a necessidade de recombinação genética no felídeo.

Nesse contexto, observa-se *T. gondii* em uma situação única dentro do filo Apicomplexa: infecta centenas de animais de sangue quente (mamíferos e aves). Nesses animais, o parasita é capaz de reconhecer e invadir células nucleadas, no interior das quais se reproduz. Acredita-se que, originariamente, *T. gondii* era um protozoário de ciclo monoxênico, como os parasitas do gênero *Eimeria* (causador da coccidiose de aves), com ciclo sexuado apenas em felídeos. A infecção de hospedeiros não felídeos pode ter-se iniciado de forma acidental, evoluindo para um ciclo de vida com dois hospedeiros. Os hospedeiros definitivos se infectariam ao ingerir oocistos eliminados nas fezes de outro hospedeiro definitivo ou cistos presentes nos tecidos de uma presa. Nessa transição, *T. gondii* tornou-se capaz de infectar outros animais não felídeos, os quais atuam como hospedeiros 'fim de linha', quando não participam da cadeia alimentar ao ser abatidos por felídeos. Esse quadro evoluiu posteriormente com a capacidade de transmissão entre hospedeiros não felídeos infectados, por carnivorismo ou ingestão de cistos teciduais. Dessa maneira, *T. gondii* pode persistir na natureza, pelo menos teoricamente, sem a participação dos hospedeiros definitivos, embora a forma ideal de disseminação ainda pareça ser a infecção de um felídeo com a consequente eliminação de milhões de oocistos (na água ou no pasto) capazes de infectar um grande número de animais, em comparação com a infecção ocasionada por uma única presa abatida para consumo por outro hospedeiro intermediário.

A capacidade atual de *T. gondii* de infectar um grande número de hospedeiros está aparentemente associada a possibilidades de reconhecimento, adesão, formação do vacúolo parasitóforo e multiplicação no interior de células hospedeiras por variados processos. Nesses processos estão envolvidos os antígenos de superfície (SAG, *surface antigens*), as proteínas de micronemas (MIC), as proteínas de róptrias (ROP e RON) e as proteínas de grânulos densos (GRA).

SAG são proteínas ancoradas na superfície celular de *T. gondii* por âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI) e funcionam como ligantes que facilitam a adesão do parasita à célula hospedeira. SAG-1 (ou P30) está presente em taquizoítas e participa efetivamente do processo. Contudo, cepas deficientes dessa proteína apresentam mecanismos alternativos de adesão, independentemente de SAG-1.

MIC são proteínas envolvidas na motilidade de *T. gondii*. Essa motilidade ocorre principalmente por deslizamento (*gliding*) na matriz extracelular, como colágeno e laminina. Existem várias proteínas de micronemas descritas, e três diferentes complexos de MIC estão sabidamente relacionados à motilidade do parasita de forma ubíqua: complexo TgMIC6, TgMIC1 e TgMIC4; complexo TgMIC8 e TgMIC3 e complexo TgMIC2 e TgM2AP (TgMIC2-*associated protein*).

ROP são proteínas com atividade enzimática (proteíno-quinases, fosfatases e proteases) em número aproximado de 30, encontradas tanto no gargalo (proteínas RON) como no bulbo das róptrias (proteínas ROP). Essas proteínas são liberadas durante a invasão da célula hospedeira, e seu conteúdo está envolvido na criação da junção móvel que projeta o parasita para o interior da célula e na formação do vacúolo parasitóforo.

GRA são proteínas encontradas abundantemente no vacúolo parasitóforo durante sua formação e são caracterizadas por nanotubos membranosos. A provável função das proteínas de grânulos densos está associada à construção da rede membranosa intravacuolar que permite a interação do parasita com a célula hospedeira.

O GENOMA DE *TOXOPLASMA GONDII*

T. gondii é composto de genoma nuclear e organelar. O DNA do núcleo contém aproximadamente 65 Mb, o mitocondrial contém 6 kb e o conteúdo de DNA do apicoplasto (organela plastídeo-*like*) é de 35 kb (Sibley & Ajioka, 2008). O genoma é haploide para a maioria dos estágios do ciclo de vida, exceto para uma breve fase diploide do oocisto.

Estudos de cariótipo molecular e mapas de ligação estabeleceram que *T. gondii* possui 14 cromossomos, designados por algarismos romanos (Cromossomos Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VIIa, VIIb, VIII, XIX, X, XI e XII) e variam em tamanho de aproximadamente 2 Mb a mais de 6 Mb. A frequência de recombinação é relativamente baixa, com 1 cM (distância entre genes para a qual 1% de recombinação ocorre) correspondendo a aproximadamente 200 kb.

Comparado com outros protozoários, incluindo apicomplexos relacionados como *Plasmodium falciparum*, *T. gondii* mantém um genoma nuclear notavelmente conservado, apesar da grande variedade de hospedeiros e do ciclo sexuado não obrigatório. Os genes de *T. gondii* são, geralmente, muito mais ricos em íntrons do que os de *Plasmodium* e *Cryptosporidium*. Como regra geral, genes para antígenos de superfície e proteínas secretadas por micronemas, róptrias e grânulos densos apresentam menos íntrons que genes constitutivos. Muitos íntrons também estão localizados próximo às extremidades dos cromossomos.

O *Toxoplasma* Genome Resource Database – ToxoDB (<http://ToxoDB.org>) contém dados de sequência genômica e anotação da cepa ME49 de *T. gondii* e de sequências genômicas das cepas GT1, VEG e RH (Cromossomos Ia e Ib), além de etiquetas de sequências transcritas (ESTs) de inúmeras cepas, representando todos os estágios do ciclo de vida do parasita. O sequenciamento do genoma de *T. gondii* tem possibilitado não só a avaliação dos fatores genéticos associados com a virulência de cepas do parasita, mas também a análise da sua estrutura populacional.

VIRULÊNCIA DE CEPAS DE *TOXOPLASMA GONDII*

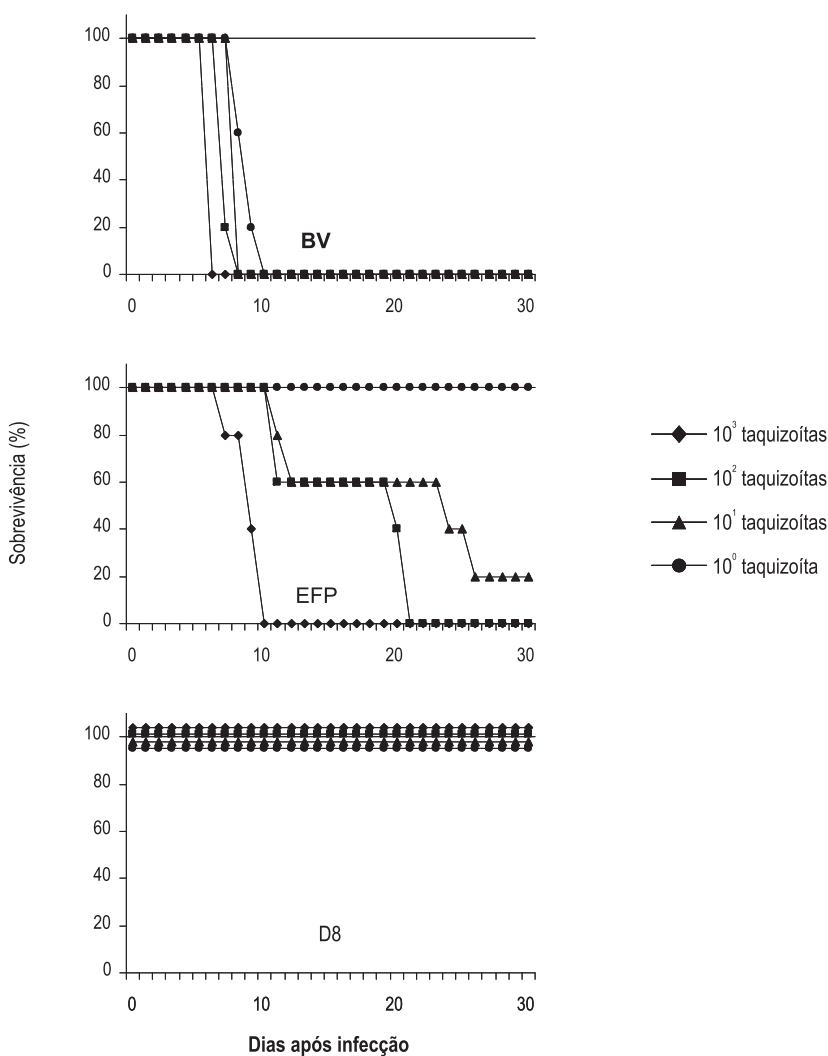
A virulência de cepas de *T. gondii* está bem caracterizada no modelo murino. Os principais critérios para sua avaliação são a taxa de mortalidade e o tempo de sobrevida de camundongos infectados com inóculos graduais de taquizoítas. Com base nesses critérios, as cepas de *T. gondii* são definidas como virulentas, não virulentas ou de virulência intermediária, dependendo da sua morbidade e mortalidade em camundongos experimentalmente infectados (Figura 1).

A cepa RH e as cepas geneticamente semelhantes a ela exibem uma dose letal de 100% (DL_{100}) equivalente a um único taquizoíta viável, enquanto cepas não virulentas, como a ME49, exibem uma $DL_{100} > 10^3$ taquizoítas, sendo as infecções crônicas facilmente estabelecidas em camundongos. As cepas com uma virulência intermediária apresentam fenótipos variáveis, geralmente apresentando $DL_{100} > 10$ taquizoítas.

Experimentos *in vivo*, *in vitro* e *ex vivo* confirmaram a existência de um fenótipo de virulência variável entre cepas de *T. gondii*, dependente de vários fatores relacionados ao parasita e ao hospedeiro. Observou-se, por exemplo, que, em relação às cepas não virulentas, cepas virulentas de *T. gondii* exibem tanto uma taxa de crescimento mais alta quanto uma capacidade migratória superior através de barreiras epiteliais. Essa capacidade de transpor barreiras biológicas, como a placenta, causando a disseminação dentro do hospedeiro, seria um pré-requisito para o estabelecimento de infecções por *T. gondii*. Dessa forma, a infecção materna por cepas virulentas durante a gestação aumentaria o risco de transmissão transplacentária, assim como a gravidade da toxoplasmose no feto em desenvolvimento.

Em camundongos, a patogênese da toxoplasmose também depende da presença ou indução de mediadores inflamatórios solúveis. Enquanto cepas avirulentas de *T. gondii* são geralmente bem controladas pela resposta imune, cepas virulentas são letais, sugerindo que elas induzem um controle imune inadequado ou são dotadas de propriedades

destrutivas que causam lesão diretamente nos tecidos. Sabe-se hoje que a capacidade de as cepas virulentas causarem infecções letais em camundongos não é decorrente da destruição direta causada pelo parasita, nem de taxas de resposta imune ineficiente, mas de uma superindução de citocinas inflamatórias. A infecção de camundongos com baixas doses de parasitas de uma cepa avirulenta resulta em uma resposta imune caracterizada por níveis moderados de INF-γ, IL-12 e TNF-α, o que leva ao controle da replicação dos parasitas e a alterações teciduais mínimas. Por outro lado, a letalidade de cepas virulentas está associada com níveis excessivos de citocinas T_H1, particularmente IL-18 e IFN-γ, no plasma. O IFN-γ provavelmente está associado ao desenvolvimento de necrose e contribui para a morte dos animais, possivelmente devido à indução da produção de óxido nítrico, cujos níveis elevados causariam alterações histopatológicas no hospedeiro (Mordue *et al*., 2001).

Figura 1 – Sobrevivência de camundongos BALB/c inoculados com injeções intraperitoneais de 10^0, 10^1, 10^2 ou 10^3 taquizoítas das cepas BV (altamente virulenta), EFP (de virulência intermediária) e D8 (não virulenta) de *Toxoplasma gondii*

Fonte: Ferreira, 2004.

Na tentativa de identificar genes determinantes de virulência em *T. gondii*, estudos de genética clássica e reversa têm sido realizados utilizando cepas genotipicamente distintas. Cruzamentos experimentais sugeriram que o fenótipo de virulência seria um traço multiloco e que a sua variação na progênie poderia ser o resultado de interações de alelos parentais em diferentes locos. Por outro lado, o cruzamento genético entre cepas de *T. gondii* com diferentes perfis de virulência possibilitou a identificação de vários locos de traço quantitativo (QTLs) associados com o fenótipo de virulência no modelo murino. O principal gene candidato, localizado no cromossomo VIIa, codifica para ROP18, membro da família ROP2, uma serina-treonina-quinase altamente polimórfica secretada durante a invasão do parasita. O mapeamento genético da ROP18 demonstrou maior expressão dessa proteína em linhagens virulentas de *T. gondii,* e a transfecção do alelo virulento em uma cepa avirulenta aumentou de forma significativa a taxa de mortalidade para camundongos. Outros genes candidatos foram encontrados nos cromossomos VIIb (ROP16) e XII (ROP5, SAG-3 e adenosina quinase), sugerindo que as quinases secretadas, características dos parasitas do filo Apicomplexa, são cruciais na interação parasita-hospedeiro (Saeij *et al*., 2006).

CLONALIDADE EM *TOXOPLASMA GONDII*

A evolução é conduzida por mutações, reprodução sexuada, recombinação e seleção natural. A reprodução sexuada em patógenos eucariotos é considerada vantajosa por promover recombinação (entre locos) e segregação (dentro do loco), que geram novas combinações de genes e, consequentemente, diversidade nas gerações subsequentes. É essa variação que confere à progênie novos potenciais biológicos, incluindo virulência, infectividade, crescimento, diferenciação e resistência a drogas. Por outro lado, a limitação do sexo permite aos patógenos gerar populações clonais bem-sucedidas, adaptadas aos seus respectivos hospedeiros e nichos ecológicos, ainda que retenham a capacidade de se reproduzir sexuadamente para permitir respostas a eventuais mudanças ambientais na natureza, no hospedeiro ou a terapias antimicrobianas.

Os organismos que possuem uma estrutura genética populacional clonal consistem em linhagens que se propagam independentemente, em sua maioria, geneticamente divergentes e de origem tipicamente ancestral, onde o sexo contribui pouco, ou nada, para a variação encontrada em populações naturais. A teoria clonal não determina que a reprodução sexuada esteja totalmente ausente em espécies basicamente clonais, mas que é muito rara para quebrar um padrão predominante da estrutura populacional clonal com todas as suas manifestações clássicas, como um desequilíbrio de ligação, ou seja, associação não randômica de alelos de diferentes locos (Tibayrenc & Ayala, 2002). Alto desequilíbrio de ligação ao longo do genoma significa que este é inteiramente transmitido entre gerações como uma unidade, como na reprodução clonal, enquanto equilíbrio de ligação ou desequilíbrio baixo significa que diferentes partes do genoma são transmitidas independentemente, como na reprodução sexuada (Lehmann *et al*., 2004).

Evidências de clonalidade, como desequilíbrio de ligação e isolamento de genótipos idênticos do parasita em diferentes hospedeiros e em regiões geográficas distintas ao longo do tempo, levaram vários pesquisadores a postular que *T. gondii* se enquadrava na teoria da propagação clonal. Segundo Grigg e Suzuki (2003), a clonalidade nessa espécie é proporcionada por dois detalhes importantes do seu ciclo de vida. Primeiro, o ciclo sexuado não é obrigatório. Assim, sem mesmo passar por um felídeo e sofrer recombinação sexuada, *Toxoplasma* é teoricamente capaz de se reproduzir e disseminar infinitamente na natureza, fazendo com que cepas particularmente bem-sucedidas venham a dominar.

O segundo aspecto que pode contribuir para a estrutura populacional clonal é o fato de *T. gondii* ser haploide. Dessa forma, um felídeo infectado com apenas uma cepa produz oocistos contendo progênies geneticamente idênticas à cepa infectante parental. A recombinação ocorreria se um felídeo se infectasse com duas cepas ao mesmo tempo, o que poderia acontecer se ele se alimentasse de uma presa que albergasse uma infecção mista ou se ingerisse duas

presas, cada uma abrigando uma cepa diferente. A ingestão de duas presas, entretanto, deveria acontecer dentro de um intervalo de tempo muito curto para permitir o cruzamento efetivo, uma vez que os gametas são abundantes apenas por um período muito breve após a primeira infecção do felídeo.

Inicialmente, as cepas de *T. gondii*, obtidas sobretudo dos Estados Unidos e da Europa, foram agrupadas em três linhagens clonais distintas correlacionadas com o fenótipo de virulência para camundongos. Contudo, uma vez que infecções de genótipo misto não só têm sido identificadas na natureza mas também induzidas experimentalmente e que a existência de cepas híbridas em populações naturais tem sido demonstrada, foi proposto que a recombinação meiótica poderia ser uma força efetiva condutora da diversidade de cepas desse organismo, indicando que a estrutura populacional de *T. gondii* é mais complexa do que a anteriormente descrita.

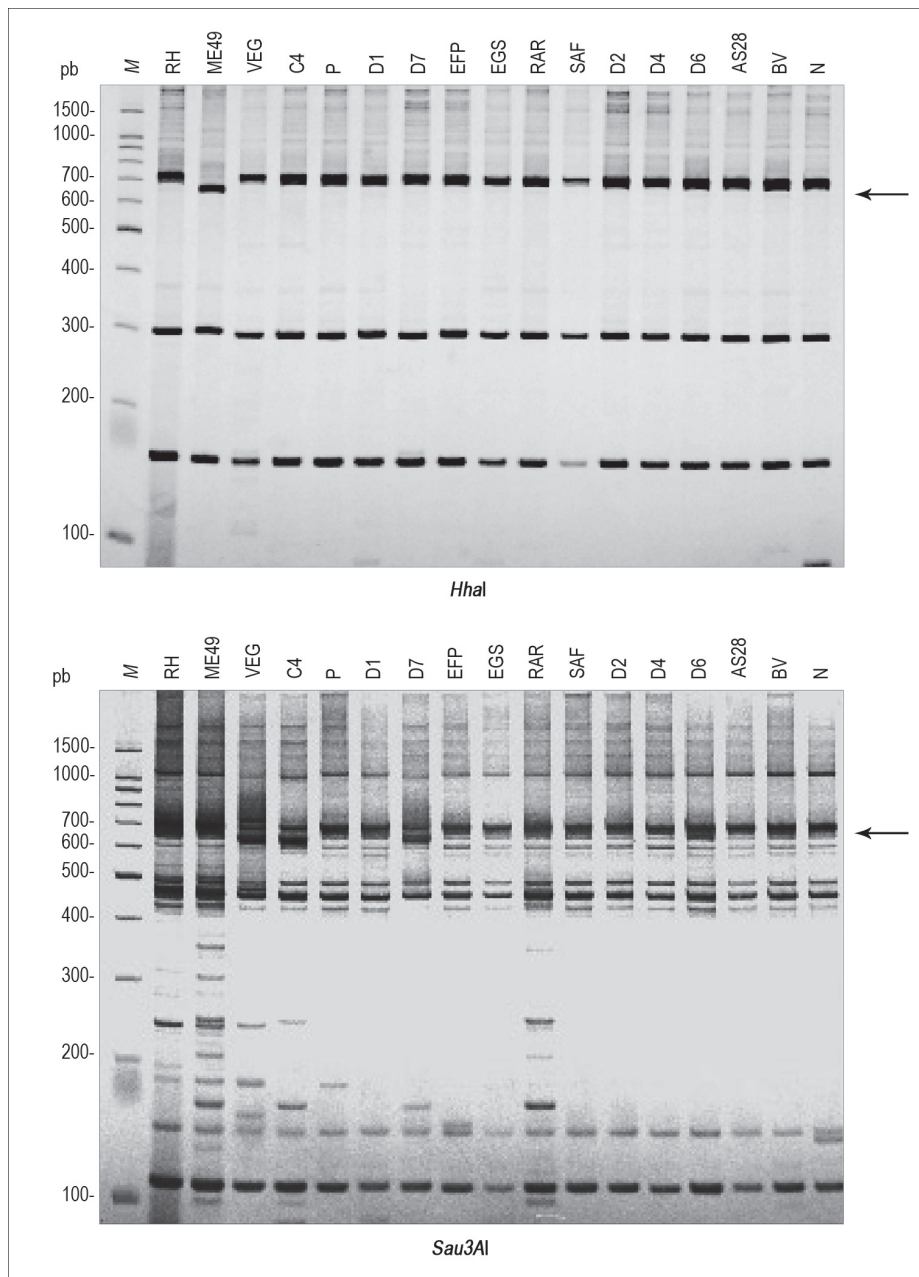
CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS E ESTRUTURA POPULACIONAL DE *TOXOPLASMA GONDII*

As cepas de *T. gondii* têm sido caracterizadas por diferentes metodologias. Demonstrou-se variação antigênica por *Western blot* e pela reatividade com anticorpos monoclonais. Detectaram-se polimorfismos genéticos por análise de sequências gênicas de proteínas de choque térmico (HSPs), amplificação aleatória do DNA polimórfico-reação em cadeia da polimerase (Rapd-PCR) e análise de microssatélites. Atualmente, a principal ferramenta utilizada para caracterização de cepas de *T. gondii* é a reação em cadeia da polimerase-polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição (PCR-RFLP), método capaz de detectar variações mínimas em um gene, em que uma única substituição de bases pode criar ou extinguir um sítio capaz de ser digerido por uma endonuclease de restrição.

Em um estudo pioneiro, Howe e Sibley (1995) analisaram 106 isolados de *Toxoplasma* obtidos de várias espécies de hospedeiros de cinco continentes para determinar a estrutura populacional de *T. gondii* e avaliar a correlação entre o genótipo do parasita e a toxoplasmose humana e animal. Os resultados, obtidos por análise de seis fragmentos de DNA (*SAG-1*, *SAG-2*, *ROP1*, *850*, *L328* e *62*), mostraram que *T. gondii* apresentava uma estrutura populacional altamente clonal, constituída de três linhagens predominantes, designadas tipo I (virulenta), tipo II e tipo III (não virulentas). Quanto à correlação entre o genótipo do parasita e o hospedeiro, houve uma predominância de cepas do tipo II associadas à toxoplasmose humana, e a frequência do tipo III foi significativamente mais alta em animais.

Em virtude da estrutura populacional clonal incomum de *T. gondii*, Howe e colaboradores (1997) desenvolveram um sistema de tipagem baseado em PCR-RFLP do loco *SAG-2*, que permite a identificação dos três genótipos clonais anteriormente descritos (tipos I, II e III). Utilizou-se amplamente esse método para genotipagem de cepas isoladas em diferentes países, principalmente da Europa e da América do Norte, permitindo a observação de que cepas com genótipo do tipo II estavam associadas com a maioria dos casos de toxoplasmose humana. Na Figura 2 observa-se um exemplo da aplicação desse método para genotipagem de cepas de *T. gondii* isoladas no Brasil.

Contudo, a genotipagem de cepas de *T. gondii* baseada em apenas um ou dois locos apresenta limitações, uma vez que impossibilita a identificação de genótipos recombinantes, também denominados atípicos, exóticos ou não arquetípicos. Dessa forma, a genotipagem multilocal de cepas provenientes de áreas mais diversas revelou diferenças na distribuição geográfica de populações de *T. gondii*. No Brasil, Ferreira e colaboradores (2006) caracterizaram cepas do parasita por PCR-RFLP em oito locos independentes (*SAG-1*, *SAG-2*, *SAG-3*, *B1*, *cB21*-4, cS10-*A6*, *GRA6* e *L363*) e observaram que todas eram recombinantes naturais (Tabela 1), fato ainda não registrado em outros locais do mundo. Esses achados foram confirmados mais recentemente em isolados de *T. gondii* obtidos em Erechim, no estado do Rio Grande do Sul, e em pacientes com toxoplasmose cerebral em São Paulo.

Figura 2 – PCR-RFLP do loco *SAG-2* para genotipagem de cepas de *Toxoplasma gondii* isoladas no Brasil, utilizando as cepas de referência RH (tipo I), ME49 (tipo II) e VEG (tipo III)

M = marcador de peso molecular (Promega, 100pb); *C* = controle negativo, sem DNA. As setas indicam os polimorfismos de restrição. A digestão do produto de amplificação de *SAG-2* com a endonuclease de restrição *Hha*I distingue cepas do tipo II de cepas dos tipos I e III; a digestão com *Sau3A*I distingue cepas do tipo III de cepas dos tipos I e II. As cepas brasileiras P, D1, EFP, EGS, RAR, SAF, D2, D4, D6, AS28, BV e N apresentam o genótipo tipo I, enquanto as cepas C4 e D7 são do tipo III.

Fonte: Ferreira, 2004.

Tabela 1 – Genótipos de cepas de *Toxoplasma gondii* isoladas de humanos e animais no Brasil determinados por PCR-RFLP em oito locos independentes. As cepas RH (TipoI), ME49 (TipoII) e VEG (TipoIII) foram utilizadas como cepas de referência

Cepa	Alelo e haplótipo no loco indicado																					E[c]
	SAG1			*SAG2*			*SAG3*		*GRA6*		*B1*			*L363*			*cS10-A6*			*cB21-4*		
	ER[a]		H[b]	ER		H	ER	H	ER	H	ER		H	ER		H	ER		H	ER	H	
	*Dde*I	*Sau*961		*Hha*I	*Sau3A*I		*Nci*I		*Mse*I		*Xho*I	*Pml*I		*Msp*I	*HpyCH4*IV		*Rsa*I	*HpyCH4*IV		*Hae*III		
RH (I)	1	1	I	1	1	I	1	I	1	I	1	1	I	1	1	I	1	1	I	1	I	1
ME49 (II)	2	2	II/III	2	1	II	2	II	2	II	2	2	II/III	2	1	II	1	2	II	2	II	2
VEG (III)	2	2	II/III	1	2	III	3	III	3	III	2	2	II/III	3	2	III	2	1	III	3	III	3
AS28	1	1	I	1	1	I	3	III	2	II	1	1	I	1	1	I	1	1	I	7	VII	4
BV	1	1	I	1	1	I	3	III	2	II	1	1	I	1	1	I	1	1	I	7	VII	4
N	1	1	I	1	1	I	3	III	2	II	1	1	I	1	1	I	1	1	I	7	VII	4
EGS	1	1	I	1	1	I	3	III	2	II	1	1	I	1	2	IV	1	1	I	6	VI	5
RAR	1	1	I	1	1	I	3	III	3	III	1	1	I	1	2	IV	1	1	I	2	II	6
SAF	1	1	I	1	1	I	3	III	3	III	1	1	I	1	2	IV	1	1	I	2	II	6
D5	1	1	I	1	1	I	3	III	3	III	1	1	I	1	2	IV	1	1	I	3	III	7
D6	1	1	I	1	1	I	3	III	3	III	1	1	I	1	2	IV	1	1	I	2	II	6
EFP	1	1	I	1	1	I	3	III	3	III	1	1	I	1	2	IV	1	1	I	5	V	8
D1	1	1	I	1	1	I	3	III	3	III	1	1	I	3	2	III	2	1	III	2	II	9
D2	1	1	I	1	1	I	3	III	3	III	1	1	I	1	2	IV	1	1	I	2	II	6
D3	1	1	I	1	1	I	3	III	3	III	1	1	I	1	2	IV	1	1	I	6	VI	10
D4	1	1	I	1	1	I	3	III	3	III	1	1	I	1	2	IV	1	1	I	3	III	11
D7	1	1	I	1	2	III	3	III	3	III	1	1	I	1	2	IV	2	1	III	2	II	12
CH1	1	1	I	1	2	III	3	III	3	III	1	1	I	3	2	III	2	1	III	2	II	13
CH2	1	1	I	1	2	III	3	III	3	III	1	1	I	1	2	IV	1	1	I	3	III	14
CH3	1	1	I	1	2	III	3	III	3	III	1	1	I	1	2	IV	1	1	I	3	III	14
C4	1	1	I	1	2	III	3	III	3	III	1	1	I	3	2	III	1	1	I	1	I	15
P	1	1	I	1	1	I	3	III	3	III	1	1	I	1	2	IV	2	1	III	4	IV	16
D8	1	1	I	1	2	III	3	III	3	III	1	1	I	1	2	IV	2	1	III	3	III	17

[a] Endonuclease de restrição utilizada para digestão do loco indicado.

[b] Haplótipo.

[c] Esquizodema.

Uma análise da variabilidade genética de 125 isolados de *T. gondii* provenientes de galinhas, cães e gatos do Brasil, utilizando dez marcadores PCR-RFLP (*SAG-1*, *SAG-2*, *SAG-3*, *BTUB*, *GRA6*, *c*22-*8*, *c*29-*2*, *L358*, *PK1* e *Apico*), possibilitou a identificação de 48 genótipos. A análise filogenética mostrou que grupos clonais também existem no Brasil, apesar de haver uma diversidade genética maior neste país em comparação ao que ocorre na América do Norte e na Europa (Figura 3). Designaram-se as linhagens clonais brasileiras como tipo BrI, tipo BrII, tipo BrIII e tipo BrIV. Esses resultados indicaram que a população de *T. gondii* no Brasil apresenta poucas linhagens clonais bem-sucedidas que se expandiram numa vasta área geográfica. A análise de mortalidade em camundongos infectados mostra que os isolados do tipo BrI são altamente virulentos; isolados do tipo BrIII não são virulentos; e os tipos BrII e BrIV apresentam virulência intermediária para camundongos (Pena *et al*., 2008). Um estudo semelhante utilizando 24 isolados de *T. gondii* provenientes de recém-nascidos com toxoplasmose congênita no estado de Minas Gerais permitiu a identificação de 14 genótipos, incluindo sete genótipos previamente identificados em animais do Brasil e outros sete novos (Carneiro *et al.*, 2013). O genótipo BrII foi observado em 29% (7/24) dos isolados e foi o tipo predominante nesse estudo. Não foi observada associação entre o genótipo de *T. gondii* e sinais clínicos de toxoplasmose nas crianças.

Figura 3 – Análise filogenética por *NeighborNet* de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos no Brasil

TgCkBr107 a 145: isolados de galinha do Pará; TgCkBr146 a 164: isolados de galinha do Rio Grande do Sul; TgCatBr1 a 37: isolados de gatos do Paraná; TgCatBr38 a 84: isolados de gatos de São Paulo; TgDgBr1 a 19: isolados de cães de São Paulo.

Fonte: Pena *et al*., 2007.

O estudo de populações diferentes de *T. gondii* realizado por Dubey e Su (2009) confirmou que a estrutura populacional do parasita presente na América do Norte e na Europa é clonal, e no Brasil a variabilidade genética intraespecífica foi mais uma vez evidenciada. Os autores citam três observações importantes sobre os isolados de *T. gondii* obtidos no Brasil: primeiro, a ausência de isolados do tipo II; segundo, isolados do tipo I são raros; terceiro, a maioria dos isolados não é clonal, sugerindo recombinação e transmissão eficiente por oocistos.

A origem de cepas híbridas de *T. gondii* tem sido objeto de diversos estudos. Grigg e colaboradores (2001) sequenciaram 15 locos imunogênicos polimórficos em cepas arquetípicas dos tipos I, II e III. As 18 cepas analisadas eram derivadas de múltiplas espécies de hospedeiros e de sítios geográficos que compreendiam três continentes. Observou-se que todos os 15 locos possuíam, em sua maioria, duas classes alélicas, designadas 'A' e 'E', em que o alelo A foi definido como a classe alélica compartilhada por pelo menos dois dos três tipos de genótipo do parasita. Para cada loco, essas duas classes alélicas estavam distribuídas aleatoriamente entre os parasitas das três linhagens. Para alguns locos, as linhagens I e II compartilhavam a mesma classe alélica e a linhagem III era diferente; para outros locos, as linhagens I e III compartilhavam a mesma classe e a II era diferente, e assim por diante. Ao sequenciarem

genes de dez cepas que possuíam genótipos diferentes daqueles das três linhagens predominantes, para metade delas as duas classes alélicas, A e E, foram as únicas identificadas, apesar de existirem em uma nova combinação. Para as outras cinco cepas analisadas, as classes alélicas A e E também predominaram, mas exemplos de um alelo verdadeiramente novo foram encontrados em alguns dos locos analisados. Os resultados desse estudo mostraram que, apesar de alelos novos ou quiméricos existirem em muitos locos variáveis da maioria das cepas exóticas, a tendência dimórfica ainda era observada e, assim, mesmo as cepas exóticas parecem ter se originado de mistura genética recente de duas linhagens ancestrais.

Khan e colaboradores (2007), ao combinar análises filogenéticas moleculares e fenotípicas, também concluíram que populações do parasita das Américas do Norte e do Sul divergiram de um ancestral comum. Mudanças populacionais antigas e recentes foram moldadas por biogeografia ao longo dos últimos milhões de anos e, mais recentemente, pela radiação adaptativa de um pequeno número de linhagens de *T. gondii* altamente bem-sucedidas, evento este associado com a origem do cromossomo monomórfico 1a (cromossomo 1a). O cromossomo 1a possui uma ancestralidade comum de aproximadamente dez mil anos e une as linhagens predominantes que são abundantes na América do Norte e na Europa. A subsequente introgressão de cepas da América do Norte na América do Sul tem sido associada a uma difusão gradual do cromossomo 1 monomórfico, tornando as populações do sul cada vez mais clonais. Embora a expansão de haplogrupos carreando esse cromossomo 1 monomórfico seja uma força impulsionadora na evolução recente de *T. gondii*, a vantagem real dessa expansão ainda não está clara (Sibley & Ajioka, 2008).

Como um exemplo da maneira pela qual duas linhagens ancestrais poderiam ter divergido e posteriormente se reunido, propôs-se que cepas do Velho e do Novo Mundo sofreram deriva por milênios e tiveram a oportunidade de cruzar após a colonização europeia do Novo Mundo, com a maciça importação e/ou exportação de animais, muitos dos quais poderiam provavelmente ter chegado infectados com cepas divergentes de *Toxoplasma* (Grigg & Suzuki, 2003). Outra hipótese é a de que *T. gondii* tenha entrado na América do Sul em associação com a migração de seus hospedeiros definitivos felinos e aqui se diversificado após o restabelecimento do canal do Panamá (Khan *et al*., 2007). Além disso, é possível que uma alta taxa de *outcrossing* (situação em que o sexo ocorre entre haplótipos não idênticos, resultando no rearranjo de material genético) em *T. gondii* possa ocorrer no Brasil por causa de uma taxa de transmissão mais alta no país quando comparada com a que existe nos Estados Unidos (Lehmann *et al*., 2004).

Com base nesses achados, o conhecimento da estrutura populacional de *T. gondii* é de grande importância na área de saúde pública e na clínica médica, uma vez que a correlação entre o genótipo do parasita e a manifestação da doença poderá fornecer marcadores que definam o prognóstico da toxoplasmose, levando ao tratamento apropriado dos pacientes com infecção por *T. gondii*. Existem evidências de que o curso clínico da toxoplasmose congênita difere em países da Europa e nos Estados Unidos, em comparação com regiões da América do Sul: a doença ocular é cinco vezes mais comum em crianças com toxoplasmose congênita, identificadas pela triagem neonatal no Brasil, do que em crianças identificadas por triagem pré-natal ou neonatal na Europa. É provável que a maior frequência e gravidade da toxoplasmose congênita no Brasil estejam associadas ao predomínio de cepas recombinantes observado no país (Gilbert *et al*., 2008).

Torna-se necessário, portanto, encontrar fatores determinantes da apresentação clínica da toxoplasmose para que medidas de controle possam ser desenvolvidas, tanto para a profilaxia como para a prevenção e o tratamento da patologia causada por *T. gondii*. Conforme salientado por Grigg e Suzuki (2003), o entendimento da variabilidade genética em uma espécie sexuada alvo para uma vacinação difundida é fundamental para reduzir qualquer possibilidade de selecionar variantes que sejam mais virulentas ou que causem novas doenças. O impacto genético desses tipos de pressão seletiva deveria ser uma importante consideração no desenvolvimento de vacinas e estratégias de controle terapêutico futuro.

REFERÊNCIAS

CARNEIRO, A. C. A. V. *et al*. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes from human congenital toxoplasmosis in Minas Gerais state, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(3): 3.901-3.907, 2013.

DUBEY, J. P. & SU, C. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 (2): 190-195, 2009.

DUBEY, J. P. *Toxoplasmosis of animal and humans*. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2010.

FERREIRA, A. M. *Caracterização molecular de cepas de* Toxoplasma gondii *isoladas no Brasil,* 2004. Tese de Doutorado, Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais.

FERREIRA, A. M. *et al*. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infection, Genetics and Evolution*, 6(1): 22-31, 2006.

GILBERT, R. E. *et al*. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2(8): e277, 2008.

GRIGG, M. E. & SUZUKI, Y. Sexual recombination and clonal evolution of virulence in *Toxoplasma*. *Microbes and Infection*, 5(7): 685-690, 2003.

GRIGG, M. E. *et al*. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. *Science*, 294(5.540): 161-165, 2001.

HOWE, D. K. & SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *Journal of Infectious Diseases*, 172(6): 1.561-1.566, 1995.

HOWE, D. K. *et al*. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(6): 1.411-1.414, 1997.

KHAN, A. *et al*. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(37): 14.872–14.877, 2007.

LEHMANN, T. *et al*. Variation in the structure of *Toxoplasma gondii* and the roles of selfing, drift, and epistatic selection in maintaining linkage disequilibria. *Infection, Genetics and Evolution*, 4(2): 107-114, 2004.

LEVINE, N. D. *The Protozoan Phylum Apicomplexa*. Boca Raton: CRC Press, 1988. 2v.

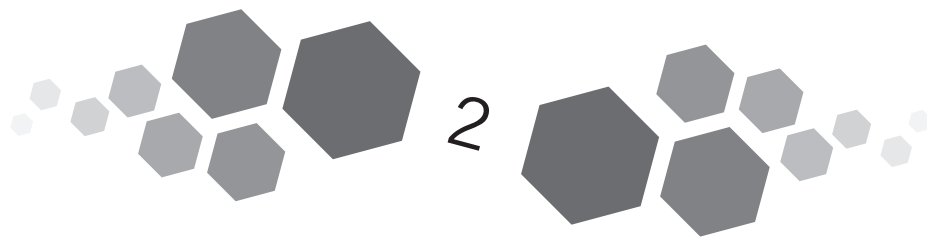
MORDUE, D. G. *et al*. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *Journal of Immunology*, 167(8): 4.574-4.584, 2001.

PENA, H. F. J. *et al*. Population structure and mouse virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *International Journal for Parasitology*, 38(5): 561- 569, 2008.

SAEIJ, J. P. *et al*. Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. *Science*, 314(5.806): 1.780-1.783, 2006.

SIBLEY, L. D. & AJIOKA, J. W. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. *Annual Review of Microbiology*, 62: 329-351, 2008.

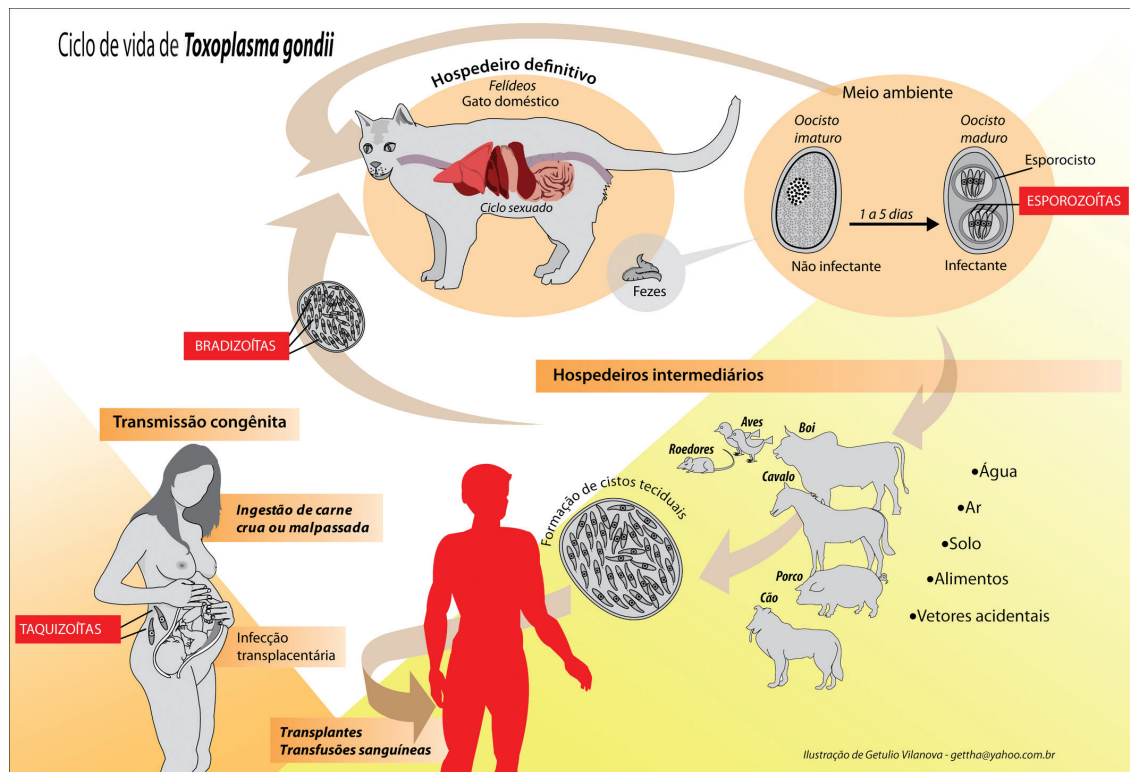
TIBAYRENC, M. & AYALA, F. J. The clonal theory of parasitic protozoa, 12 years on. *Trends in Parasitology*, 18(9): 405-410, 2002.

2

O Ciclo Evolutivo

Helene Santos Barbosa • Renata Morley de Muno • Marcos de Assis Moura

BREVE HISTÓRICO

Embora a identificação do *Toxoplasma gondii* tenha ocorrido em 1908, sua transmissão permaneceu um mistério durante trinta anos. Em 1939 houve a primeira evidência da transmissão congênita. Ainda assim, o ciclo evolutivo, a explicação de sua ampla distribuição geográfica e as vias de transmissão permaneceram na obscuridade até 1970. A evidência de que o toxoplasma é um parasita intracelular obrigatório, por exemplo, só foi demonstrada experimentalmente em 1937 por Sabin e Olitsky. Na década de 1950, uma das principais questões entre os cientistas era explicar como tantos animais e seres humanos se infectavam com *T. gondii*. Inúmeras foram as tentativas de demonstrar o envolvimento de artrópodes nessa transmissão, devido à presença do parasita no sangue dos hospedeiros, sem sucesso. O conhecimento dos estágios infecciosos, de taquizoítas e de cistos teciduais levou à hipótese de que o carnivorismo pudesse ser um mecanismo de infecção (Weinman & Chandler, 1954). A demonstração, em 1960, por Jacob e colaboradores, da resistência de bradizoítas derivados de cistos teciduais (presentes em carne crua ou malcozida) às enzimas proteolíticas permitiu a Desmonts, Couvreur e Ben Rachid (1965) testarem esta hipótese, confirmando que esta era uma das vias de transmissão do parasita. Esses dados conflitavam com a alta incidência de infecção entre os herbívoros e vegetarianos. Esse quadro de dúvida foi elucidado por Hutchison (1965), que identificou o oocisto como a forma resistente do parasita. Assim, nos anos 1970 o ciclo de vida do toxoplasma foi desvendado quase simultaneamente por vários grupos (revisto em Dubey, 2008; 2009; Ferguson, 2009): o estágio oocisto presente nas fezes de gatos era derivado do desenvolvimento sexual do parasita no intestino dos felinos. Esse conhecimento permitiu a incorporação do gato ao ciclo evolutivo do toxoplasma, como seu hospedeiro definitivo, e animais de sangue quente, como hospedeiros intermediários. Assim, as vias de transmissão do parasita foram estabelecidas por duas rotas principais: congênita e infecção oral por diferentes estágios infecciosos – cistos teciduais por carnivorismo, pela ingestão de carne crua ou malpassada e pela ingestão de oocistos presentes em alimentos, no solo ou na água, o que justifica a sua alta incidência entre os vegetarianos e herbívoros (revisto em Jones e Dubey, 2010). Na Figura 1, representa-se o ciclo de transmissão do toxoplasma.

Figura 1 – Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii*: vias de transmissão entre os hospedeiros intermediários e definitivos

Fonte: Moura, Amendoeira & Barbosa, 2009.

FORMAS INFECTANTES

As formas evolutivas do *T. gondii* responsáveis pela infecção dos hospedeiros intermediários e definitivos são: cistos teciduais (contendo bradizoítas) presentes em carnes e vísceras de organismos infectados; taquizoítas encontrados em diversos tecidos e fluidos corporais e os esporozoítas encontrados no interior de oocistos eliminados pelas fezes dos hospedeiros definitivos (Dubey, Lindsay & Speer, 1998; Dubey, 2002). Existem, entretanto, diferenças quanto à infectividade de cada uma dessas formas de acordo com o hospedeiro. Das três formas infectantes, o cisto tecidual, contendo os bradizoítas, parece ser a forma mais efetiva para infecção de felídeos, resultando, após a sua ingestão, na liberação de oocistos nas fezes de quase todos os animais testados. Em contrapartida, oocistos e taquizoítas, quando ingeridos por felídeos, levam à produção de oocistos em menos de 30% dos animais infectados (Ferguson, 2009). A formação de oocistos parece ser uma etapa natural do ciclo de vida do *T. gondii* em felídeos, não estando relacionada ao estado imunológico do hospedeiro (Dubey, 2009).

Taquizoítas

O termo 'taquizoíta' (*taqui-* = 'rápido' em grego) foi criado por Frenkel (1973) para descrever o estágio evolutivo do parasita, que se multiplica rapidamente dentro de muitos tipos celulares do hospedeiro intermediário e nas células epiteliais não intestinais do hospedeiro definitivo. Taquizoítas também têm sido chamados de trofozoítos, endodiozoítos ou endozoítos, que são termos mais antigos (revisto em Dubey, Lindsay & Speer, 1998). Os taquizoítas

possuem formato elíptico (6 µm x 2 µm) e são obrigatoriamente intracelulares de todas as células nucleadas. Invadem as células preferencialmente por penetração ativa, são encontrados no interior de vacúolos parasitóforos e, eventualmente, são intranucleares (Dubey, 2002; Barbosa *et al.*, 2005; Jones & Dubey, 2010). A multiplicação dos parasitas intravacuolares ocorre por endodiogenia, que é a forma especializada de multiplicação assexuada, onde duas células-filhas se formam no interior da célula-mãe (De Souza, 1974). Cessada a replicação, os taquizoítas completam seu ciclo lítico: deixam o vacúolo e alcançam o meio extracelular pelo rompimento da membrana plasmática da célula hospedeira, disseminando-se pela via hematogênica ou linfática para vários tecidos (Dubey, 1998). Os taquizoítas são o estágio responsável pela fase aguda da infecção. As características ultraestruturais das formas evolutivas serão tratadas no Capítulo 3.

Cistos Teciduais

Depois de um número desconhecido de divisões e mecanismos ainda não bem esclarecidos, os taquizoítas de *T. gondii* do interior das células dão origem a outro estágio evolutivo denominado bradizoíta. Essa forma infecciosa tem como principal característica biológica a capacidade de se reproduzir lentamente (*bradi-* = lento, em grego). O termo foi criado por Frenkel (1973) e é também conhecido como cistozoíta (revisto em Dubey, Lindsay & Speer, 1998). Os bradizoítas medem aproximadamente 7µm x 1,5 µm (Weiss & Kim, 2000). Os eventos que se seguem após a diferenciação dos bradizoítas são as alterações morfológicas da membrana e da matriz do vacúolo parasitóforo, constituindo a parede cística e dando origem ao cisto tecidual, estrutura característica da fase crônica da infecção (Weiss & Kim, 2000; Guimarães *et al.*, 2007). Cistos teciduais variam de tamanho: os jovens podem medir cerca de 5 µm de diâmetro e conter somente dois parasitas, enquanto os mais velhos podem conter centenas de organismos, alcançando em média 60 µm de diâmetro. Embora os cistos teciduais se desenvolvam em diversos órgãos como pulmões, fígado e rins, eles são prevalentes nos tecidos muscular e nervoso, incluindo o cérebro, olhos e músculos esquelético e cardíaco (Speer, Clark & Dubey, 1998; Weiss & Kim, 2000; Jones & Dubey, 2010). Cistos teciduais no cérebro são frequentemente esféricos e raramente alcançam 70 µm de diâmetro, enquanto cistos intramusculares são alongados e podem atingir 100 µm de tamanho (Dubey, 1998).

Os cistos teciduais podem permanecer latentes por toda a vida do hospedeiro sem causar uma resposta inflamatória ou imunológica, evitando, assim, sua destruição (Hill & Dubey, 2002). Durante o curso da infecção, os cistos teciduais podem romper-se, e com a diferenciação de bradizoítas em taquizoítas (conversão), reinvadem outras células hospedeiras e se rediferenciam em bradizoítas (interconversão), formando um novo cisto tecidual (Tenter, Heckeroth & Weiss, 2000).

A parede dos cistos teciduais é rica em açúcares e outros polissacarídeos, elástica e pouco densa (< 0,5 µm de espessura), e é constituída por uma membrana e pela região granular (localizada na face interna dessa membrana). A região granular é formada por um material elétron-denso granuloso que também preenche os espaços entre os bradizoítas (Weiss & Kim, 2000; Guimarães, Carvalho & Barbosa, 2003; Guimarães *et al.*, 2007). É bem aceito na literatura que a parede cística tenha sua origem molecular na célula hospedeira e/ou no produto de secreção do parasita intravacuolar. A parede cística e a matriz cística provavelmente promovem uma barreira física contra o sistema imune do hospedeiro (Weiss & Kim, 2000).

Em alguns estudos, demonstra-se a existência de tropismo maior para formação de cistos cerebrais em pequenos roedores, independentemente da cepa de *T. gondii*, enquanto para grandes mamíferos como bovinos, ovinos e caprinos os cistos são predominantemente musculares (Dubey & Jones, 2008).

Oocistos

Oocistos contêm formas infectantes de *T. gondii* e são produzidos no epitélio intestinal dos felídeos (hospedeiros definitivos) e eliminados, ainda imaturos, junto com as fezes no meio ambiente, onde sofrem maturação (Tenter, Heckeroth & Weiss, 2000). Esse processo de maturação ou esporulação, que ocorre no meio ambiente, pode durar de um a cinco dias, sob a influência da oxigenação, umidade e temperatura adequadas (Hill & Dubey, 2002; Dubey, 2004). Os oocistos não esporulados têm forma ovalada e dupla membrana. Os oocistos esporulados são elípticos, contêm dois esporocistos e cada esporocisto possui quatro esporozoítas. Os esporozoítas medem cerca de 6-8 μm x 2 μm. Morfologicamente, representam a forma intermediária entre taquizoítas e bradizoítas, considerada a quantidade de determinadas organelas: número intermediário de micronemas, um número superior de grânulos densos em relação aos taquizoítas e muitos grânulos de amilopectina como os bradizoítas. Caracterizam-se pela presença de muitos grânulos lipídicos, que parecem ser uma exclusividade dos esporozoítas (Dubey, Lindsay & Speer, 1998; Speer, Clark & Dubey, 1998; Ferguson, 2004; Speer e Dubey, 2005).

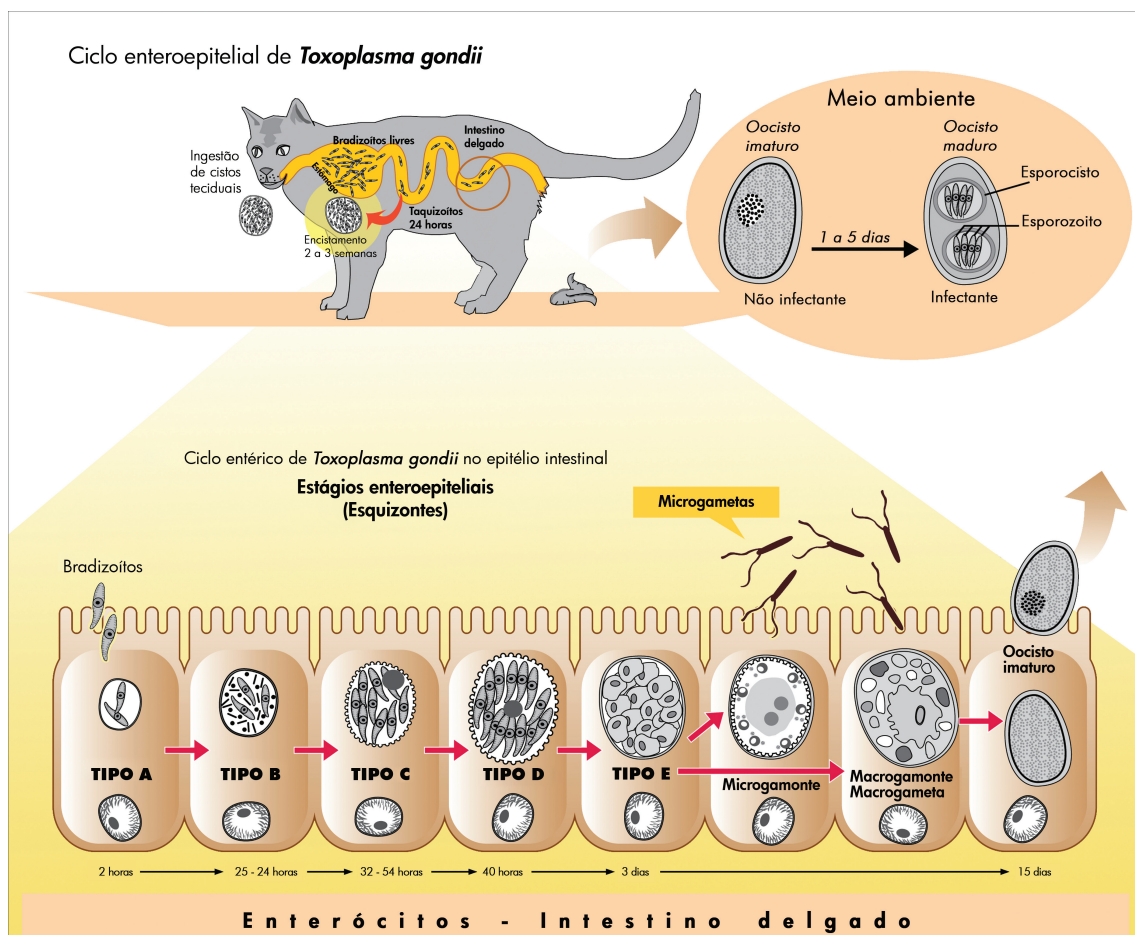
A formação de oocistos ocorre mediante reprodução sexuada ou ciclo enteroepitelial exclusivo de gatos domésticos e outros felídeos, nos quais se observam (no epitélio intestinal, mais precisamente na região jejunoileal do intestino delgado) os processos de esquizogonia, gametogonia e esporogonia (Hill & Dubey, 2002; Ferguson, 2009; Jones & Dubey, 2010).

O ciclo sexuado de *T. gondii* pode-se iniciar por qualquer forma infectante do parasita: bradizoítas dos cistos presentes em carnes, taquizoítas em diversos tecidos e fluidos corporais e esporozoítas em oocistos esporulados (Dubey, 2004; Jones & Dubey, 2010). O tempo de pré-patência e a frequência da liberação de oocistos dependem da forma infectante ingerida: de três a dez dias após ingerir cistos teciduais ou bradizoítas, maior ou igual a 13 dias após a ingestão de taquizoítas e de 18 ou mais dias após ingestão de oocistos (Dubey, 2004; Dubey & Jones, 2008). Após a ingestão dos cistos teciduais pelos gatos, a parede cística é destruída por enzimas proteolíticas do estômago e do intestino delgado. Os bradizoítas são liberados e penetram na parede intestinal, iniciando o desenvolvimento de várias gerações de *T. gondii*. Ocorrem cinco estágios enteroepiteliais, ou esquizontes distintos, tipos A, B, C, D e E (Ferguson, 2004; Speer & Dubey, 2005; Dubey, 2009; Ferguson, 2009).

Os esquizontes se localizam entre a superfície interna e o núcleo dos enterócitos (Ferguson, 2004; Speer & Dubey, 2005). Os estágios enteroepiteliais ocorrem de maneira sequencial e são morfologicamente semelhantes aos demais tipos infecciosos de *T. gondii* (Dubey & Frenkel, 1972) como representados na Figura 2. A diferenciação mais acentuada fica restrita à estrutura do vacúolo parasitóforo (VP) que, neste caso, é repleto de uma rede de membranas tubulovesiculares (RMTV) (Ferguson, 2004; Speer & Dubey, 2005). O ciclo enteroepitelial se inicia pelo esquizonte do tipo A, que é observado nos enterócitos superficiais e às vezes na lâmina própria intestinal dos gatos, após 12 a 18 horas da ingestão de cistos. Possui núcleo centralizado, pode ser corado pelo Giemsa e é negativo para o ácido periódico de Shiff (PAS). O esquizonte do tipo B ocorre de 12 a 54 horas pós-infecção e se multiplica por endodiogenia, enquanto os demais se multiplicam por endopoligenia (forma especializada de multiplicações assexuadas em que várias células-filhas se formam no interior da célula-mãe) (De Souza, 1974). Apresenta núcleo centralizado e alguns grânulos situados na periferia citoplasmática são positivos para PAS. A divisão destes organismos é pleomórfica, existindo organismos com três ou mais núcleos (Dubey & Frenkel, 1972). No interior de enterócitos, localizam-se em um grande vacúolo parasitóforo, cuja matriz é rica em RMTV (Dubey & Frenkel, 1972). Esquizontes do tipo B multiplicam-se por endodiogenia e ultraestruturalmente são muito similares aos taquizoítas, porém ocorrem exclusivamente em enterócitos felinos, medindo 5,8 μm x 2,9 μm. Possuem poucos e pequenos grânulos de amilopectina e róptrias pouco definidas (Dubey & Frenkel, 1972). Muitos esquizontes do tipo B permanecem no mesmo VP após várias divisões

e formam grandes estruturas multinucleadas, que possuem numerosos corpos lipídicos e mitocôndria com matriz elétron-densa moderada (Dubey & Frenkel, 1972; Speer, Clark & Dubey, 1998).

O esquizonte do tipo C se desenvolve entre 24 e 32 horas no interior do vacúolo parasitóforo de enterócitos, multiplicando-se por endopoligenia em forma de roseta (Dubey & Frenkel, 1972). Individualmente é alongado com o núcleo subterminal, fortemente positivo para PAS e mede 6,1 μm x 1.5 μm (Dubey & Frenkel, 1972). Os esquizontes do tipo C contêm poucos micronemas e grânulos densos, muitos corpos lipídicos e pequenas mitocôndrias (Speer & Dubey, 2005). A forma intermediária do esquizonte do tipo C apresenta vários núcleos com nucléolos evidentes. O vacúolo parasitóforo não contém RMTV e sua membrana é intimamente associada à membrana do esquizonte. Os esquizontes intermediários se desenvolvem por endopoligenia. O VP em torno dos esquizontes do tipo C maduros contém pequenos agregados de material granular, a RMTV e a membrana do vacúolo parasitóforo são intimamente associadas à membrana do esquizonte do tipo C, que apresenta duas mitocôndrias proeminentes, róptrias elétron-densas e grânulos de amilopectina (Speer & Dubey, 2005). Eventualmente, durante a multiplicação ocorre a formação de um corpo residual medindo aproximadamente 2 μm x 3 μm, contendo resíduos de mitocôndria, ribossomos, retículo endoplasmático e grânulos de amilopectina (Speer, Clark & Dubey, 1998; Speer & Dubey, 2005).

Figura 2 – Estágios enteroepiteliais do ciclo de *Toxoplasma gondii* nas células epiteliais superficiais do intestino delgado do gato doméstico

Fonte: Moura, Amendoeira & Barbosa, 2009.

Entre 32 horas e 15 dias pós-ingestão de cistos teciduais, são observados os esquizontes do tipo D, que são abundantes nas células epiteliais da base das vilosidades intestinais, e após quarenta horas começam a dividir-se em múltiplos núcleos. Por meio de divisão nuclear assimétrica, geram organismos de vários aspectos morfológicos (Dubey & Frenkel, 1972; Ferguson, 2004; Speer & Dubey, 2005). Ultraestruturalmente, os esquizontes do tipo D (5,8 μm x 1,3 μm) apresentam róptrias elétron-densas, preenchidas com material granular e localizadas acima do complexo de Golgi (Speer & Dubey, 2005).

Finalmente, a partir de três até 15 dias pós-infecção já se observam os estágios pré-gametogênese caracterizados pela presença do esquizonte do tipo E, que apresenta um corpúsculo residual com parasitas em forma de roseta (Dubey & Frenkel, 1972; Ferguson, 2004; Speer & Dubey, 2005). Os esquizontes do tipo E surgem a partir de esquizontes do tipo D que escaparam para células vizinhas. Assim, esse tipo celular apresenta características ultraestruturais distintas, como membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) elétron-densa, numerosas e proeminentes mitocôndrias situadas logo abaixo da película do esquizonte do tipo E (4,5 μm x 1,1 μm), apresentam róptrias elétron-densas e diversos corpos granulares e medem cerca de 300 nm a 600 nm de diâmetro (Speer & Dubey, 2005).

Os tipos A, B e C ocorrem de forma sequencial, ou seja, o tipo A conduz à formação dos tipos B e C, e estes amadurecem rapidamente e desaparecem conforme vão surgindo as formas do tipo D (Dubey & Frenkel, 1972). Os gametócitos só são observados na ausência dos tipos A, B e C. Os tipos D e E ocorrem simultaneamente com os gametas, sugerindo que estes sejam precursores dos gametas ou variantes do mesmo estágio biológico evolutivo (Dubey & Frenkel, 1972; Speer & Dubey, 2005).

As fases evolutivas dos tipos A, B, C, D e E parecem ser exclusivas do ciclo do toxoplasma, uma vez que, em estudos com outros coccídeos, estes tipos nunca foram observados (Dubey & Frenkel, 1972). Durante a gametogênese, ocorre a formação dos microgametas (5,7 μm x 3,5 μm), que possuem o núcleo bastante pequeno e dois flagelos longos, uma única mitocôndria, núcleo elétron-denso e complexo membranar interno com aproximadamente 12 microtúbulos. O VP é preenchido por material elétron-lucente (Speer & Dubey, 2005). Os macrogametas (8,1 μm x 6,0 μm) contêm todas as organelas comuns ao gênero, além de corpos formadores de parede de tipos I e II, corpos lipídicos e grânulos de amilopectina. O VP contém material levemente granular, moderadamente elétron-denso e com poucos vacúolos granulares (Dubey, Lindsay & Speer,1998; Ferguson, 2004; Speer & Dubey, 2005).

Os microgametas, quando saem das células da parede intestinal, caem na luz intestinal e são atraídos por quimiotaxia até os macrogametas (Dubey & Frenkel, 1972; Speer & Dubey, 2005). A fecundação ocorre nas células intestinais, dando origem ao ovo ou zigoto, que após formar sua parede se diferencia para oocisto imaturo e rompe os enterócitos, sendo liberado juntamente com as fezes dos felídeos no meio ambiente, onde ocorrerá a esporogonia (Dubey & Frenkel, 1972; Speer & Dubey, 2005).

Gatos domésticos podem excretar milhões de oocistos imaturos após ingerirem apenas um bradizoíta ou um cisto tecidual (Dubey, 1998a; Dubey, Lindsay & Speer, 1998). Geralmente, menos de 1% da população de gatos pode ser encontrada liberando oocistos. Os oocistos são liberados por apenas um curto intervalo de tempo (de uma a duas semanas) na vida do gato (Jones & Dubey, 2010).

Um estudo recente revela que em condições naturais os gatos domésticos podem eliminar oocistos depois de uma primoinfecção por até três semanas, principalmente na primeira semana (Jones & Dubey, 2010). Em condições de laboratório, gatos com bom estado imunitário podem reeliminar oocistos quando alimentados com cistos teciduais seis dias após a primeira infecção (Dubey, 1995). Infecções concomitantes, desnutrição e imunossupressão também podem favorecer uma nova liberação de oocistos (Dubey, 1995; Dubey, Lindsay & Lappin, 2009).

Desta forma, os felídeos – principalmente os gatos domésticos – fazem o papel de disseminadores do parasita e hospedeiros definitivos, e liberam no ambiente uma grande quantidade de oocistos, que, quando esporulados, podem permanecer viáveis por muitos meses ou anos, contaminando o solo, água e alimentos (Dubey & Frenkel, 1972; Speer, Clark & Dubey, 1998; Tenter, Heckeroth & Weiss, 2000; Hill & Dubey, 2002; Dubey, 2004; Jones & Dubey, 2010).

A quantidade e o número de vezes que os gatos eliminam naturalmente oocistos na natureza ainda não estão bem esclarecidos. Essa questão apresenta algumas dificuldades: além do número baixo de animais que eliminam oocistos em investigações parasitológicas (< 1%), a detecção de oocistos nas fezes apresenta vários problemas técnicos, incluindo a baixa sensibilidade dos testes imunológicos utilizados; semelhança morfológica com oocistos de *Hammondia hammondi* (e outros coccídeos); e os diagnósticos moleculares ainda apresentam reatividade cruzada com outros protozoários, além do elevado custo (Jones & Dubey, 2010).

Devemos ressaltar também que oocistos de *T. gondii* são altamente resistentes ao meio ambiente e suas influências, incluindo o congelamento, podendo permanecer até 54 meses viáveis na água fria (Dubey, 1998). Oocistos também não são inativados pelos tratamentos físicos e químicos tradicionais em estações de tratamento de água, incluindo a cloração, o tratamento de ozônio e os raios ultravioleta (Jones & Dubey, 2010).

CICLO DE VIDA DE *TOXOPLASMA GONDII*

A transmissão da toxoplasmose pode ocorrer basicamente por duas vias: horizontal, pela ingestão oral de oocistos liberados no ambiente junto com as fezes de gatos, ou de cistos teciduais encontrados em carne crua ou em vísceras cruas ou malcozidas dos hospedeiros intermediários; e pela via vertical, por transmissão transplacentária dos taquizoítas. *T. gondii* é disseminado por praticamente todos os animais de sangue quente, como aves e mamíferos, incluindo os seres humanos, em cujo organismo ocorre apenas a reprodução assexuada do parasita, atuando como seus potenciais hospedeiros intermediários e reservatórios. Em muitos hospedeiros os taquizoítas podem também ser transmitidos pelo leite. Assim, o parasita circula do hospedeiro definitivo para o intermediário ou vice-versa, bem como entre os hospedeiros definitivos e entre os hospedeiros intermediários (Dubey, 2002; Hill & Dubey, 2002; Dubey, 2004). De qualquer modo, a prevalência da infecção não é confinada exclusivamente à presença do hospedeiro definitivo, fazendo que seu ciclo de vida continue por meio da transmissão de cistos teciduais entre os hospedeiros intermediários (Tenter, Heckeroth & Weiss, 2000).

Além disso, as vias de transmissão são as mais amplas possíveis, envolvendo a água, solo e ar e potencialmente veículos de disseminação como insetos e vermes (Jones & Dubey, 2010).

Nas últimas décadas, a infecção por *T. gondii* por meio da água vem ganhando mais importância. Um marco desse registro é o relato de um surto no Brasil envolvendo 155 pessoas que consumiram água de um poço artesiano contaminada com fezes de gatos (Moura *et al.*, 2006). No Brasil, a falta de tratamento da água tem sido relatada como uma importante fonte de infecção em regiões com toxoplasmose endêmica, entre a população de classe socioeconômica baixa (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003). Além disso, a cada ano aumentam os relatos de mamíferos aquáticos apresentando toxoplasmose, indicando a contaminação e veiculação do parasita pela água, inclusive do mar (Dubey & Jones, 2008).

Para melhor compreensão das vias de transmissão de *T. gondii*, os ciclos biológicos serão apresentados com base nas formas de transmissão predominantes.

Transmissão Ambiental

O ciclo ambiental ou fecal-oral de *T. gondii* se desenvolve logo após a ingestão de oocistos presentes no solo, na água não tratada, sobre frutas e verduras mal lavadas ou veiculados por insetos, aves e/ou pequenos roedores sinantrópicos (Dubey, 2004; Jones & Dubey, 2010).

No estômago, enzimas proteolíticas destroem a parede do oocisto, liberando os esporozoítas na luz intestinal, os quais invadem ativamente as células intestinais epiteliais superficiais. No interior das células, localizam-se sempre em vacúolos parasitóforos, e no seu interior se convertem imediatamente em taquizoítas iniciando sua reprodução rápida, por endodiogenia (Speer & Dubey, 2005; Ferguson, 2009). Dessa forma, o parasita atravessa rapidamente as células epiteliais intestinais e alcança outros tipos celulares em diversos tecidos por meio da circulação sanguínea e/ou linfática, mantendo sua multiplicação intracelular rápida por endodiogenia (Tenter, Heckeroth & Weiss, 2000).

A mudança no ritmo de multiplicação do parasita é provocada pela resposta imunológica do hospedeiro relacionada à regulação na produção principalmente das citocinas IL-10, TGF-β, IL27 e IL-12 pelos linfócitos TCD4+, que modulam a patogênese da toxoplasmose sistêmica e local (Gaddi & Yap, 2007). O processo de endodiogenia passa a ocorrer de forma lenta com interconversão dos taquizoítas em bradizoítas e formação de cistos teciduais (Dubey, 1998; Gaddi & Yap, 2007). Embora os fatores imunológicos do hospedeiro participem decisivamente da modulação da multiplicação e interconversão de *T. gondii*, estudos sugerem que há uma base genética para a virulência do parasita, ou seja, cepas do tipo I (virulentas) tendem a manter uma taxa de replicação acelerada, enquanto cepas dos tipos II e III (avirulentas) favorecem o encistamento e cronificação da infecção (Appleford & Smith, 2000).

Transmissão pelo Carnivorismo

Os cistos teciduais são predominantes durante a infecção crônica em todos os hospedeiros de *T. gondii*, mas podem começar a ser produzidos ainda durante a fase aguda (Dubey, Lindsay & Speer, 1998; Dubey & Jones, 2008). Estes são mais frequentemente encontrados no sistema nervoso central, na retina e na musculatura esquelética e cardíaca. Entretanto, também podem ocorrer mais raramente em vísceras como pulmão, fígado e rins (Dubey, Lindsay & Speer, 1998; Tenter, Heckeroth & Weiss, 2000; Dubey & Jones, 2008). Em alguns estudos, demonstra-se a existência de tropismo maior para formação de cistos cerebrais em pequenos roedores, independentemente da cepa de *T. gondii*, enquanto para grandes mamíferos ruminantes – como bovinos, ovinos e caprinos – os cistos são predominantemente musculares (Tenter, Heckeroth & Weiss, 2000; Dubey & Jones, 2008).

Este ciclo é mais comum e bastante eficiente entre os carnívoros e onívoros que se infectam com cistos teciduais de *T. gondii* após a ingestão de carne crua ou malcozida (Ferguson, 2009). Da mesma maneira que ocorre com os oocistos, a parede cística será digerida por enzimas proteolíticas estomacais, liberando bradizoítas que penetram ativamente na mucosa intestinal ou são endocitados por células fagocíticas, interconvertendo-se em taquizoítas, desta forma acelerando a sua multiplicação, alcançando o leito vascular ou linfático para sua disseminação pelo organismo e novamente iniciando seu encistamento (Dubey, Lindsay & Speer, 1998; Tenter, Heckeroth & Weiss, 2000; Weiss & Kim, 2000; Hill & Dubey, 2002).

Transmissão Transplacentária

A transmissão congênita ou transplacentária da toxoplasmose é resultante da infecção primária materna durante a gravidez ou perto do parto (Montoya & Liesenfeld, 2004). A infecção pode ocorrer pela ingestão de oocistos ou cistos teciduais, com a liberação de esporozoítas ou bradizoítas, respectivamente, e o desenvolvimento do ciclo

intracelular dos parasitas que determinará sua conversão em taquizoítas. Alcançando a circulação materna, os taquizoítas atravessam a barreira fetoplacentária e proliferam irrestritamente nos tecidos fetais imunologicamente imaturos (Kravetz & Federman, 2005). As consequências deste tipo de infecção irão depender principalmente da idade gestacional no momento da infecção, variando desde o aborto a lesões neurológicas ou oculares no nascimento, ou ainda pode ocorrer uma infecção latente, em que os sinais clínicos irão se manifestar meses ou anos após o nascimento (Montoya & Liesenfeld, 2004; Kravetz & Federman, 2005).

Outras Formas de Transmissão do Toxoplasma

Além das formas de transmissão do toxoplasma já citadas, é possível relacionar algumas de pouco valor epidemiológico e que apresentam baixos riscos de transmissão. Estas vias estão relacionadas à falta de cuidados com a manipulação de material infectado ou ainda a acidentes laboratoriais.

O leite materno, de vaca ou de cabra pode conter e eliminar taquizoítas durante uma infecção aguda, sendo assim potencialmente infectante. A transmissão também pode ocorrer por transfusões de sangue, e transplantes de tecidos e órgãos, quando cistos presentes nos tecidos transplantados são provavelmente a fonte da infecção (Hill & Dubey, 2002; Montoya & Liesenfeld, 2004). Outro tipo de transmissão de pouca relevância epidemiológica está relacionado à infecção por acidentes laboratoriais, que ocorrem principalmente pela manipulação e ingestão de oocistos esporulados em amostras de fezes de felinos ou através da inoculação ou contato direto com taquizoítas ou bradizoítas, isolados de amostras animais, humanas ou de cultivos celulares (Herwaldt, 2001).

PERSPECTIVAS DO ESTUDO DO CICLO DE *TOXOPLASMA GONDII*

Em estudos recentes, demonstra-se a possibilidade da reprodução parcial do ciclo enteroepitelial de *T. gondii* em culturas primárias de enterócitos felinos (Moura, Amendoeira & Barbosa, 2009). A relação parasita-célula hospedeira é um aspecto crucial para o destino intracelular de *T. gondii* nessas células. Por exemplo: a conversão bradizoíta-taquizoíta é observada 72 horas após a infecção (h.p.i.) e os VPs apresentam exclusivamente taquizoítas, como visualizados pela marcação com anticorpo SAG-1 (Figura 3-A). Na revelação de filamentos de actina (Figura 3-A), pode-se observar que os VPs adquirem a forma das culturas primárias epiteliais intestinais de felino (CEIF) sem comprometer seu alinhamento e polarização (Figura 3-A) e visto também por coloração de Giemsa (Figura 3-B). A utilização da relação de 1:10 (parasita-célula hospedeira) mostra a formação de estruturas semelhantes a cistos intracelulares com seis dias após a infecção (d.p.i.) (Figura 3-C). A análise por microscopia de luz de culturas coradas com Giemsa permitiu observar VPs morfologicamente diferentes, com estruturas no seu interior semelhantes a sincícios (Figura 3-D). Nessas mesmas condições, por análise ultraestrutural revelaram-se, pela primeira vez *in vitro*, enterócitos contendo vacúolos com apenas um parasita na matriz vacuolar, repleta da rede membranar tubulovesicular bem desenvolvida, como observado na Figura 4-A e em detalhe na Figura 4-B. Esta é uma forte evidência de que a sinalização ou modulação molecular estaria desencadeando a diferenciação de bradizoítas em esquizontes do tipo A para o tipo B, à semelhança do que tem sido descrito no intestino de gatos *in vivo* (Speer & Dubey, 2005). Perfis de retículo endoplasmático, mitocôndrias e corpos lipídicos da célula hospedeira foram sempre observados em associação com a membrana dos VPs (Figura 4-A). Além da caracterização ultraestrutural de esquizontes do tipo B, foi possível a observação de esquizontes em divisão do tipo endodiogenia assincrônica, típica da fase assexuada dos estágios enteroepiteliais (Figura 4-C e D). Os esquizontes desorganizados foram vistos no interior de VPs sem a formação característica de rosetas típicas, imersos na rede membranar tubulovesicular bastante desenvolvida (Figura 4-C e D).

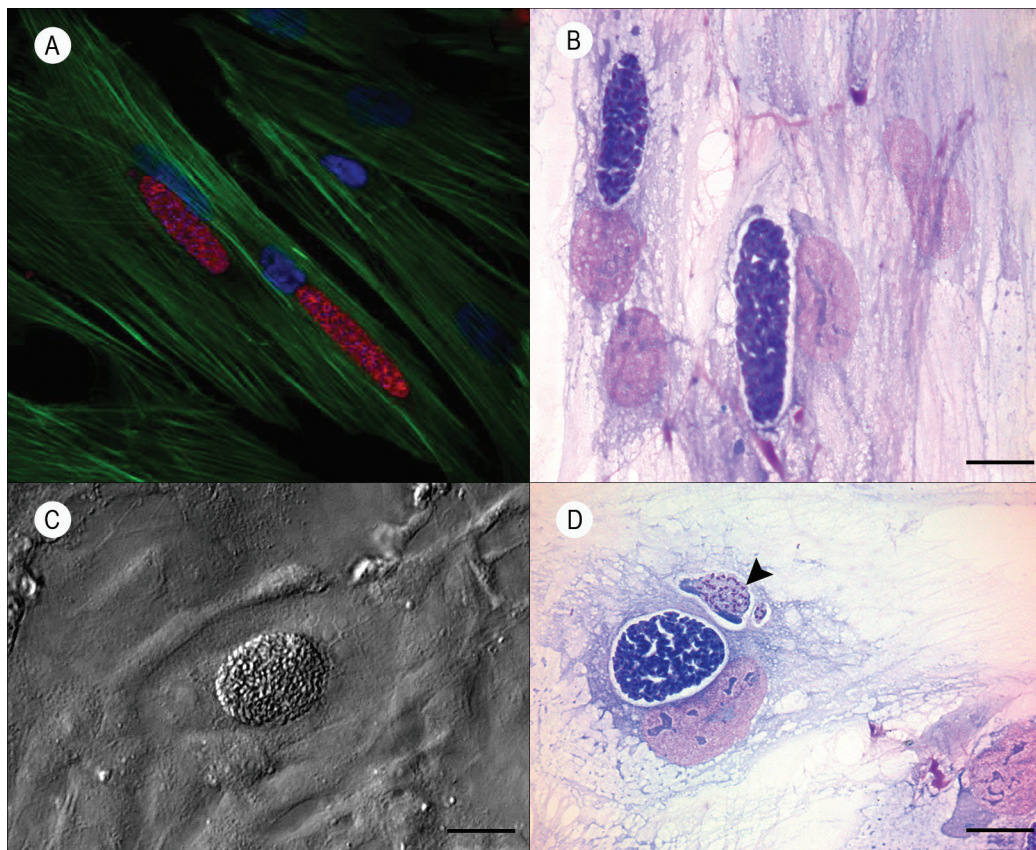
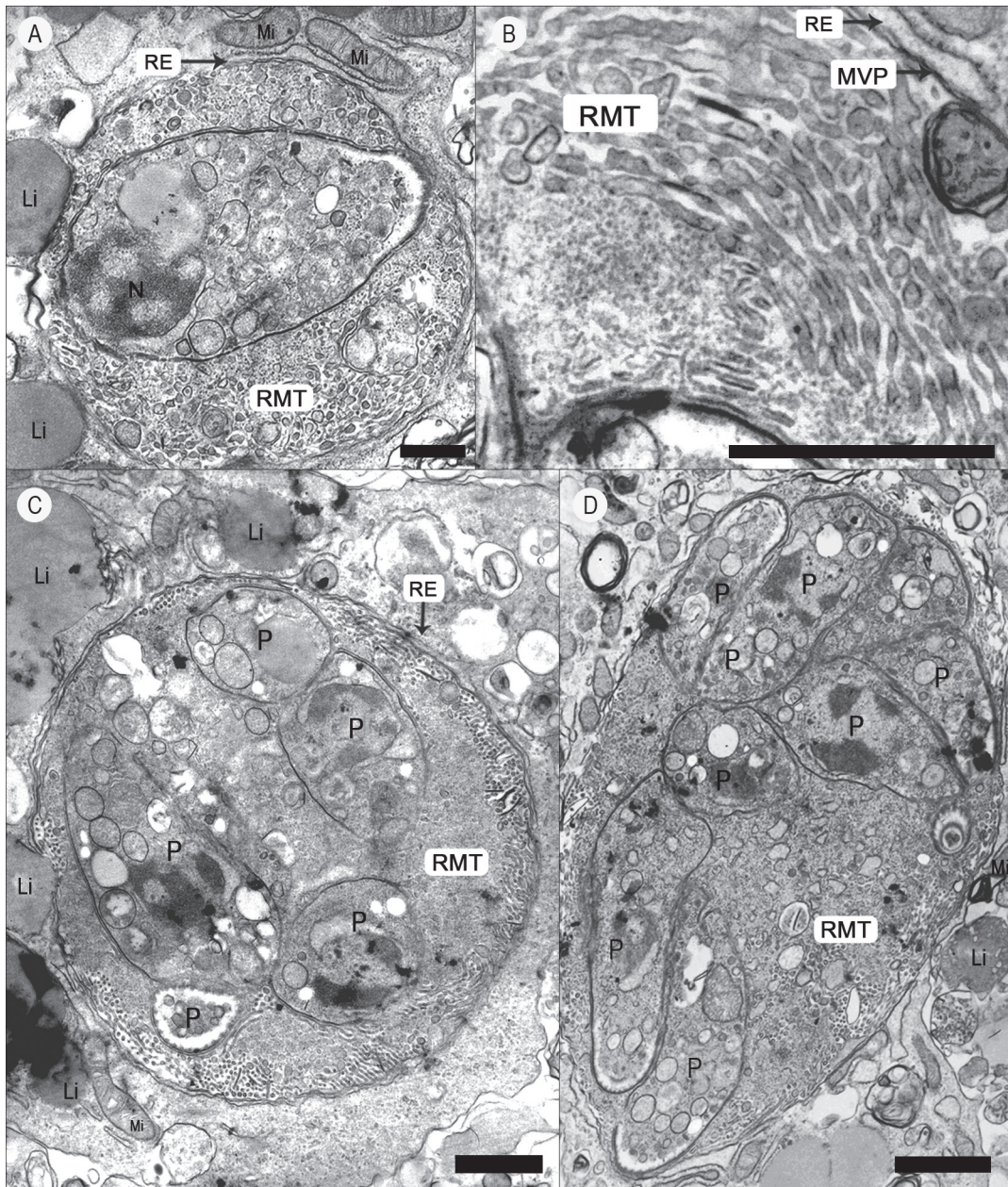
Figura 3 – Interação de bradizoítas de *Toxoplasma gondii* cepa ME49 com culturas primárias epiteliais intestinais de felino

Relação 1:5 parasita-célula hospedeira 72 horas após infecção (h.p.i.). A – Nota-se a presença do vacúolo parasitóforo contendo exclusivamente taquizoítas, confirmada pela imunomarcação com anticorpo anti-SAG-1/TRITC (vermelho). Filamentos de actina revelados com Faloidina-FITC (verde) e núcleos marcados com DAPI (azul). B – Coloração por Giemsa mostra um vacúolo contendo taquizoítas. Interação na relação 1:10 parasita-célula hospedeira. C – Formação de estruturas císticas com 6 d.p.i. observadas por microscopia interferencial. D – Coloração por Giemsa – microscopia de luz. Nota-se, além da forma cística, um vacúolo parasitóforo com parasitas em formação sincicial (cabeça de seta). Barra de 20 nm.

Figura 4 – Formação de esquizontes precursores dos estágios enteroepiteliais de *Toxoplasma gondii in vitro* com 6 d.p.i.

A – Observa-se o vacúolo parasitóforo frouxo, repleto da rede membranar tubulovesicular (RMT). Nota-se a MVP associada a perfis de retículo endoplasmático (RE), Mitocôndria (Mi) e lipídios (Li). B – Detalhe em grande aumento da característica morfológica do vacúolo parasitóforo apresentando RMT bem desenvolvida no seu interior. C e D – Parasitas em divisão por endodiogenia assincrônica. C – vacúolo parasitóforo contendo cinco parasitas (P) em processo de divisão no interior de vacúolo parasitóforo rico em RMT com associação de RE e Li à MVP. D – Outra célula em que se observa número ímpar de parasitas no vacúolo parasitóforo (n = 9) indicativo de divisão assincrônica. Barra de 500 nm.

A reprodução de alguns estágios enteroepiteliais de *T. gondii in vitro* ratifica a hipótese de que este ciclo deva ser orquestrado e modulado por moléculas presentes nos enterócitos de felinos, tendo em vista o alto grau de especificidade do parasita por esse único hospedeiro definitivo (Moura, Amendoeira & Barbosa, 2009).

A introdução desse modelo celular na investigação do ciclo entérico de *T. gondii* abre as seguintes perspectivas: substituição gradativa do modelo animal para esses estudos; possibilidade de contribuir com novos subsídios sobre a biologia celular do parasita; possibilidade de explorar os aspectos moleculares desta interação que contribuam, por exemplo, para o desenvolvimento de novas estratégias visando à intervenção numa das principais vias de disseminação da toxoplasmose.

REFERÊNCIAS

APPLEFORD, P. J. & SMITH, J. E. Strain and stage specific variation in *Toxoplasma gondii* antigens. *International Journal for Parasitology*, 30: 1.187-1.191, 2000.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. *et al*. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro State, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 9: 55-62, 2003.

BARBOSA, H. S. *et al*. Absence of vacuolar membrane involving *Toxoplasma gondii* during its intranuclear localization. *The Journal of Parasitology*, 91: 182-184, 2005.

DESMONTS, G.; COUVREUR, J. & BEN RACHID, M. S. Toxoplasmosis, the mother and the child. *Archives Françaises de Pédiatrie*, 22: 1.183-1.200, 1965.

DE SOUZA, W. Aspectos ultraestruturais do processo de divisão do *Toxoplasma gondii*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 8: 45-65, 1974.

DUBEY, J. P. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. *The Journal of Parasitology*, 81: 410-415, 1995.

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 28: 1.019-1.024, 1998.

DUBEY, J. P. Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. *The Journal of Parasitology*, 88: 713-717, 2002.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: a waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology*, 126: 57-72, 2004.

DUBEY, J. P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 39: 877-882, 2009.

DUBEY, J. P. & FRENKEL, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *The Journal of Protozoology*, 19: 155-177, 1972.

DUBEY, J. P. & JONES, J. L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International Journal for Parasitology*, 38: 1.257-1.278, 2008.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. & SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical Microbiology Reviews*, 11: 267-299, 1998.

DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. & LAPPIN, M.R. Toxoplasmosis and other intestinal coccidial infections in cats and dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice,* 39: 1009-1034, 2009.

FERGUSON, D. J. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. *International Journal for Parasitology*, 34: 347-360, 2004.

FERGUSON, D. J. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 133-148, 2009.

FRENKEL, J. K. *Toxoplasma* in and around us. *BioScience*, 23: 343–352, 1973.

GADDI, P. J. & YAP, G. S. Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. *Immunology and Cell Biology*, 85: 155-159, 2007.

GUIMARÃES, E. V.; CARVALHO, L. & BARBOSA, H. S. An alternative technique to reveal polysaccharides in *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98: 915-917, 2003.

GUIMARÃES, E. V. *et al*. Anionic sites on *Toxoplasma gondii* tissue cyst wall: expression, uptake and characterization. *Micron: The International Research and Review Journal for Microscopy*, 38: 651-658, 2007.

HERWALDT, B. L. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 659-688, 2001.

HILL, D. & DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clinical Microbiology and Infection*, 8: 634-640, 2002.

HUTCHISON, W. M. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature*, 206: 961-962, 1965.

JONES, J. L. & DUBEY, J. P. Waterborne toxoplasmosis: recent developments. *Experimental Parasitology*, 124: 10-25, 2010.

KRAVETZ, J. D. & FEDERMAN, D. G. Toxoplasmosis in pregnancy. *Association of Professors of Medicine*, 118: 212-216, 2005.

MONTOYA, J. G. & LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. *The Lancet*, 363: 1.965-1.976, 2004.

MOURA, L. *et al*. Waterborne outbreak of toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerging Infectious Diseases*, 12: 326-329, 2006.

MOURA, M. A.; AMENDOEIRA, M. R. & BARBOSA, H. S. Primary culture of intestinal epithelial cells as a potential model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 862-864, 2009.

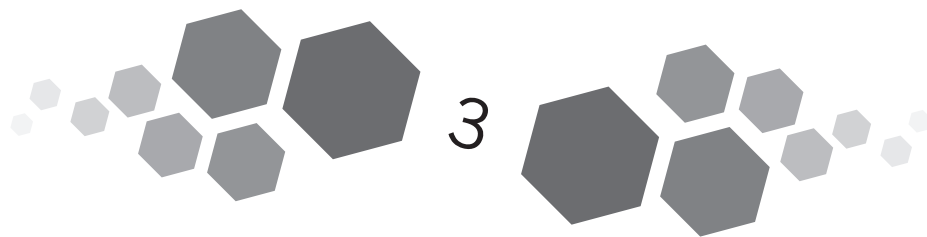
SABIN, A. B. & OLITSKY, P. K. Toxoplasma and obligate intracellular parasitism. *Science*, 85: 336-338, 1937.

SPEER, C. A. & DUBEY, J. P. Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. *International Journal for Parasitology*, 35: 193-206, 2005.

SPEER, C. A.; CLARK, S. & DUBEY, J. P. Ultrastructure of the oocysts, sporocysts, and sporozoites of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Parasitology*, 84: 505-512, 1998.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R. & WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, 30: 1.217-1.258, 2000.

WEINMAN, D. & CHANDLER, A. H. Toxoplasmosis in swine and rodents; reciprocal oral infection and potential human hazard. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 87: 211-216, 1954.

WEISS, L. M. & KIM, K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library*, 5: D391-405, 2000.

A Organização Estrutural de *Toxoplasma gondii*

Márcia Attias • Rossiane Claudia Vommaro • Wanderley de Souza

Toxoplasma gondii, agente etiológico da toxoplasmose, é um protozoário intracelular obrigatório capaz de infectar e se replicar em qualquer célula nucleada de mamíferos e aves. É uma das infecções parasitárias mais comuns ao homem e a outros animais homeotérmicos. Possui ampla distribuição, infectando de maneira crônica aproximadamente um terço da população mundial. Pertence ao filo Apicomplexa, no qual estão incluídos diversos patógenos de importância médica e veterinária, como *Plasmodium* spp. (agente causador da malária), *Cryptosporidium* spp. (causador de diarreias graves em imunocomprometidos), *Eimeria* spp. (causador da coccidiose em aves) e *Besnoitia* sp., *Babesia bovis* e *Theileria* spp. (parasitas de gado). Do ponto de vista estrutural, o filo Apicomplexa é caracterizado pela presença do *complexo apical*, composto de organelas secretórias especializadas, como róptrias e micronemas, e de elementos do citoesqueleto, como os anéis polares e o conoide, este último apenas nos coccídeos, subclasse que inclui *T. gondii* (Figura 1).

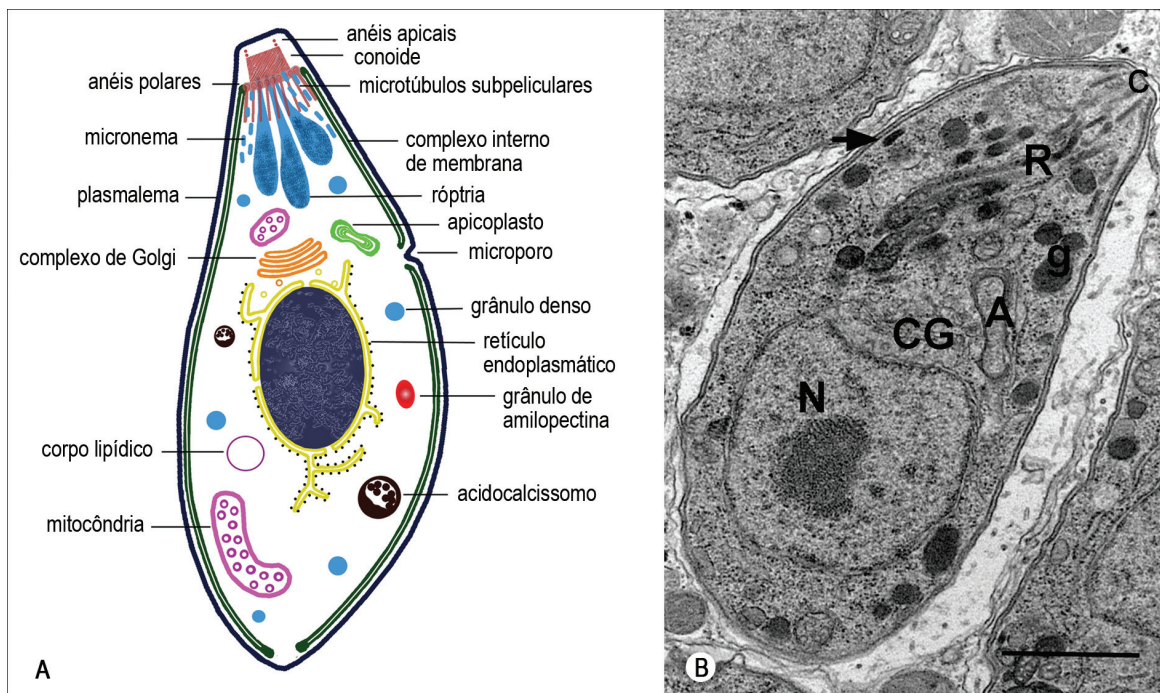
O ciclo de vida de *T. gondii* apresenta uma fase assexuada, que se passa na maioria dos animais, e uma fase sexuada, que se passa nos felídeos. Ao longo de todo o ciclo, este protozoário pode assumir três formas infecciosas: taquizoítas (forma de multiplicação rápida da fase aguda), bradizoítas (forma de multiplicação lenta, encontrada dentro de cistos teciduais) e esporozoítas (forma encontrada nos oocistos). Além dessas, durante o ciclo entérico há a formação de gametas masculinos e femininos (vide capítulo 2, "O ciclo evolutivo").

Neste capítulo, a descrição da estrutura de *T. gondii* está baseada principalmente nos dados disponíveis para a forma taquizoíta, que tem sido mais estudada. No entanto, faremos algumas considerações sobre as formas bradizoíta e esporozoíta.

ORGANIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DO TAQUIZOÍTA DE *TOXOPLASMA GONDII*

O taquizoíta de *T. gondii* (Figura 1) é uma célula polarizada, de forma alongada, apresentando a região anterior afilada e a região posterior arredondada. Mede aproximadamente 8 μm de comprimento por 2 μm de largura. Na região anterior ou apical estão localizados os anéis polares, o conoide, as róptrias e os micronemas, estruturas que formam o

complexo apical. O núcleo situa-se na região mediana e acima deste dispõem-se o complexo de Golgi e o apicoplasto. Compondo o envoltório nuclear e ramificando-se pelo citossol, estão presentes elementos do retículo endoplasmático. A mitocôndria é única e ramificada. Grânulos densos, acidocalcissomos e grânulos de amilopectina estão presentes em número e localização variáveis. O conjunto é envolvido pela película, e abaixo desta, partindo do anel polar posterior, irradiam-se os microtúbulos subpeliculares que percorrem o corpo celular no eixo longitudinal até cerca de dois terços de sua extensão (revisto em Dubey, Lindsay & Speer, 1998).

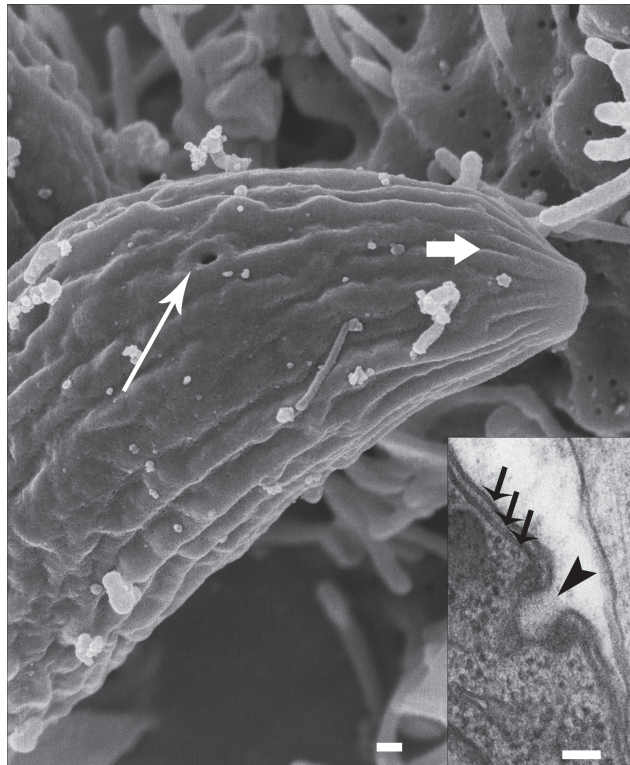
Figura 1 – Morfologia geral da forma taquizoíta de *Toxoplasma gondii*

A – Representação esquemática assinalando as principais organelas e estruturas conforme observações em microscopia eletrônica de transmissão. B – Microscopia eletrônica de transmissão de uma forma taquizoíta de *Toxoplasma gondii*. Neste corte longitudinal podem ser observadas várias das estruturas representadas em A: N (núcleo), c (conoide), R (róptrias), A (apicoplasto), CG (complexo de Golgi), g (grânulo denso), seta (micronema), VP (vacúolo parasitóforo). Barra de 1 μm.

ASPECTOS BÁSICOS DA MORFOLOGIA DE *TOXOPLASMA GONDII*

Película

O taquizoíta é envolto por uma estrutura trimembranar, a película, formada pela membrana plasmática e pelo complexo membranar interno (CMI). Este é formado pela associação íntima de longas cisternas achatadas, interrompidas em vários pontos de sua superfície e que mantêm uma distância fixa da membrana plasmática. Em cortes transversais a esta película observados ao microscópio eletrônico de transmissão, nota-se a presença de duas unidades de membrana justapostas formando o complexo. O espaço delimitado pelas membranas do CMI é considerado uma região especializada do retículo endoplasmático, uma vez que em seu interior foi detectada a presença da enzima glicose-6-fosfatase, característica do retículo endoplasmático. Estudos por criofratura mostraram no CMI proteínas intramembranosas alinhadas em 22 fileiras correspondendo aos 22 microtúbulos subpeliculares (Morrissette, Murray & Roos, 1997).

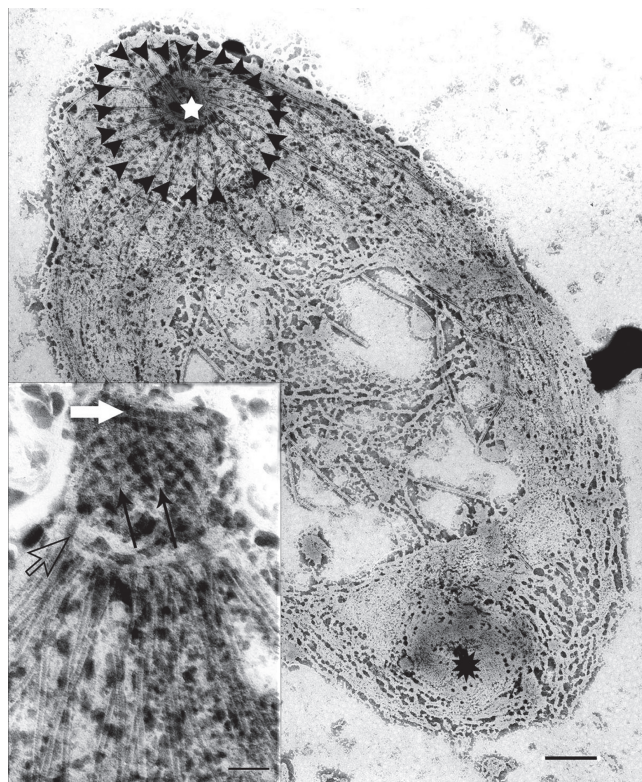
A membrana plasmática é contínua. Porém, o CMI se estende desde o anel polar posterior, que faz parte do complexo apical, descrito abaixo, até a extremidade posterior do parasita, apresentando fenestras em vários pontos, em especial no polo apical, na extremidade posterior e na região do microporo. O microporo é uma estrutura medindo aproximadamente 150 nm de diâmetro localizada na metade superior do parasita, anterior ao núcleo. O microporo se forma pela invaginação da membrana plasmática pela interrupção do CMI, que se dobra formando um anel elétron-denso ao redor da invaginação. Esta estrutura parece estar envolvida na ingestão de macromoléculas por processo endocítico, atuando como um citóstoma (Figura 2).

Figura 2 – Microscopia eletrônica de varredura de um taquizoíta de *Toxoplasma gondii* sobre uma célula em cultura

É claramente visível o relevo da membrana sobre os microtúbulos subpeliculares que se distribuem radialmente a partir da extremidade anterior (seta larga). A seta fina aponta para o microporo, estrutura análoga ao citóstoma nesses protozoários. No inserto o microporo é visto em corte longitudinal (cabeça de seta). As três setas menores apontam para as três unidades de membrana que formam a película. Na região do microporo as duas membranas internas estão interrompidas e a membrana plasmática sofre uma invaginação. Barras de 200 nm.

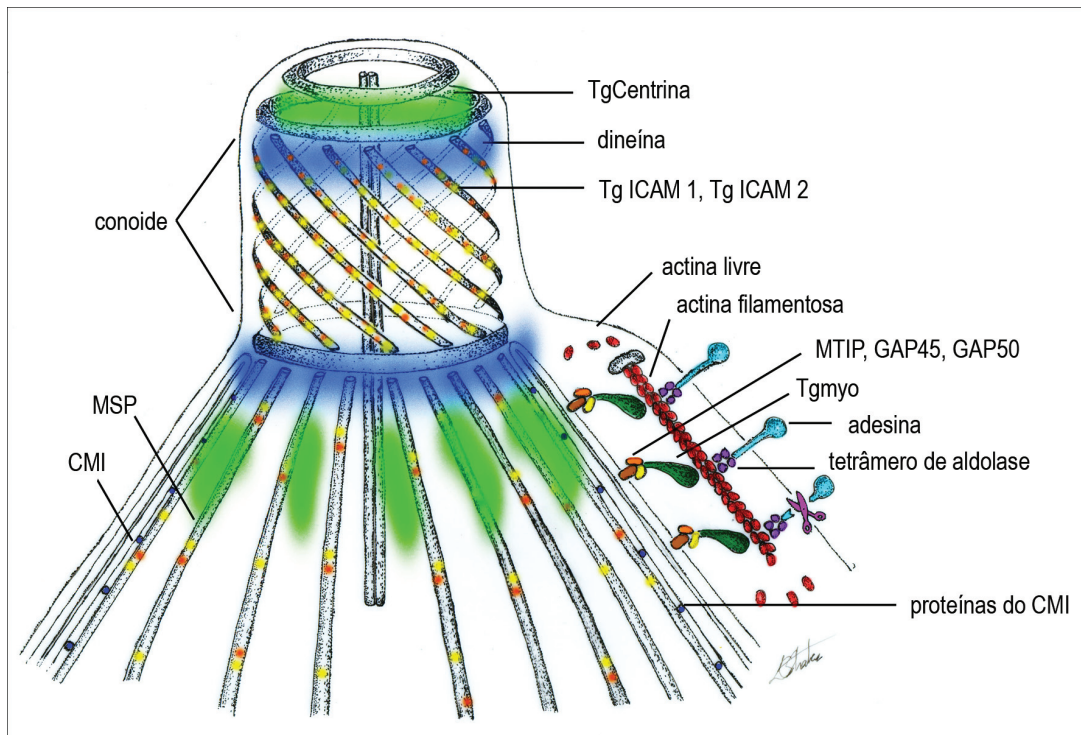
Citoesqueleto

As primeiras observações do citoesqueleto de *T. gondii* foram feitas ao microscópio eletrônico de transmissão em taquizoítas previamente tratados com detergentes e soluções hipotônicas e contrastados negativamente, revelando um arcabouço de microtúbulos subpeliculares que confere integridade estrutural básica ao parasita. Partindo da extremidade apical do protozoário encontram-se logo abaixo da membrana plasmática dois anéis apicais. O superior mede 160 nm de diâmetro, enquanto o inferior, 200 nm. Abaixo destes, encontra-se um anel polar posterior, onde está o centro organizador de microtúbulos (revisto em Souza, DaMatta & Attias, 2009), de onde partem 22 microtúbulos subpeliculares, compostos de 13 protofilamentos cada um. A natureza molecular destes três anéis ainda é desconhecida.

Os microtúbulos subpeliculares, por sua vez, distribuem-se de modo equidistante sob o CMI e se estendem por dois terços do corpo do parasita (Figuras 3 e 4). Além desses 22 microtúbulos, dois microtúbulos de aproximadamente 400 nm de comprimento percorrem o eixo central do protozoário (Figura 3) passando por dentro do conoide. Este é uma estrutura cilíndrica e oca situada entre os anéis polares apicais e o anel polar posterior. O conoide mede aproximadamente 400 nm de diâmetro e 250 nm de altura. Tanto o conoide quanto os microtúbulos subpeliculares são constituídos basicamente pela proteína tubulina. Entretanto, enquanto os microtúbulos possuem a típica conformação de 13 protofilamentos, nas fibras do conoide a tubulina se apresenta polimerizada em uma conformação ímpar que resulta em fibrilas constituídas por nove protofilamentos em forma de vírgula justapostas em arranjo espiralado (Hu, Roos & Murray, 2002). Tanto pela observação de parasitas vivos ao microscópio óptico quanto em cortes ultrafinos e mesmo em microscopia eletrônica de varredura, sabe-se que o conoide é uma estrutura móvel, que se desloca para cima e para baixo do anel polar posterior (Figura 3 e Figura 4). Estes movimentos podem ser artificialmente induzidos por substâncias que disparam o influxo intracelular de cálcio, como a ionomicina. O tratamento com citocalasina D, em contrapartida, inibe a extrusão dessa estrutura. Entretanto, até o momento, não foi possível associar o movimento de extrusão ao fenômeno de secreção de róptrias e micronemas que ocorre durante a invasão das células hospedeiras.

Figura 3 – Contrastação negativa de *Toxoplasma gondii*

Microscopia eletrônica de transmissão da extração da película com detergentes revela a estrutura do citoesqueleto com microtúbulos subpeliculares (cabeças de seta) distribuindo-se radialmente a partir do anel polar, no centro do qual está o conoide (estrela branca). Além dos microtúbulos, o citoesqueleto também compreende uma rede subpelicular que se estende até a porção posterior do parasita e termina numa estrutura circular de maior densidade (asterisco preto). No inserto, maior aumento da região apical onde se vê a disposição em espiral das fibras do conoide, o par central de microtúbulos (setas pretas) além do anel apical (seta branca) e o anel polar (seta vazada). Barras de 0,5 μm. Inserto: 200 nm.

Fonte: Reproduzido de Souza, Attias & Da Matta, 2009.

Figura 4 – Esquema da porção anterior de um taquizoíta de *Toxoplasma gondii* reunindo o conhecimento atual sobre a organização estrutural e molecular do citoesqueleto

TgMyo: miosina XIV; MTIP: domínio da cauda de MyoA; proteínas do CMI: proteínas do complexo membranar interno; Tg ICAM 1 e 2: proteína de adesão intercelular de toxoplasma. A presença de TgCentrina e ICAM 1 e 2 foi confirmada; entretanto, sua interação estrutural com outros componentes do citoesqueleto ainda não foi determinada. TgCentrina está presente na região dos anéis polares apicais e em pontos distribuídos abaixo do anel polar (regiões sombreadas), enquanto a marcação para dineína foi positiva tanto no topo quanto na base do conoide. ICAM 1 e 2 se dispõem em consonância com as fibras espiraladas do conoide e ao longo dos microtúbulos subpeliculares (MSP). As moléculas envolvidas no deslizamento (*gliding*) estão representadas à direita, onde a escala real entre a membrana plasmática e o complexo interno de membranas (CMI) foi desconsiderada para permitir a representação das diversas moléculas já identificadas.

Fonte: Adaptado de Attias & de Souza, 2009.

Associação entre a Película, o Citoesqueleto e a Motilidade do Parasita

A íntima associação entre a película e o citoesqueleto foi evidenciada primeiramente pela observação de réplicas de criofratura, que mostraram fileiras de partículas intramembranosas (proteínas transmembrana) em arranjos lineares coincidentes com a distribuição dos microtúbulos subpeliculares na membrana pelicular interna. Esta associação permite que *T. gondii* simultaneamente mantenha sua integridade mecânica e se locomova e infecte células ativamente, mesmo sem possuir apêndices locomotores como *pili*, cílios, flagelos ou pseudópodos. A maquinaria molecular envolvida na movimentação do parasita, por um processo denominado *gliding* ou deslizamento, vem sendo progressivamente elucidada.

T. gondii apresenta um mecanismo motor, inserido entre a membrana plasmática e o complexo membranar interno que permite a geração de força entre componentes do citoesqueleto e substratos extracelulares, resultando no deslizamento (*gliding*) do parasita. Em poucas palavras, este supõe a adesão do parasita ao substrato (*e. g.*, matriz

extracelular, membrana das células hospedeiras) por meio de adesinas, proteínas transmembrana com domínios semelhantes à trombospondina (TRAP), que se localizam internamente nos micronemas e que são liberadas quando o protozoário é estimulado, inserindo-se posteriormente à membrana plasmática. Em *T. gondii* a proteína denominada MIC2 é a adesina mais bem estudada. Liga-se por sua porção citoplasmática a filamentos curtos e muito dinâmicos de actina via uma aldolase. A actina, por sua vez, interage com a cabeça de TgMyo (um tipo de miosina da classe XIV (MyoA) exclusivo do toxoplasma), miosina de cadeia leve (MLC1) e duas proteínas associadas a este conjunto de moléculas – GAP45 e GAP50. GAP50 é uma proteína integral de membrana ancorada em sítios ricos em colesterol no CMI e é responsável pelo ancoramento deste complexo proteico, denominado 'glideossomo', a esta membrana (Daher & Soldati-Favre, 2009) (Figura 4). O resultado das forças de adesão da MIC2, tração da TgMYO, fluxo de membranas no sentido anteroposterior e ancoragem do conjunto aos microtúbulos subpeliculares à rede subpelicular leva ao deslizamento do protozoário observado ao microscópio óptico. A presença de actina e miosina foi detectada inicialmente por imunofluorescência. Sem o uso de drogas, a visualização de filamentos de actina em microscopia eletrônica de transmissão não foi possível até o momento. Entretanto, filamentos de actina foram observados por microscopia eletrônica de transmissão com o uso de jasplakinolida, droga que induz a polimerização desses filamentos.

Rede Subpelicular

Além dos microtúbulos subpeliculares, abaixo do CMI situa-se a rede subpelicular, composta por filamentos interconectados de 8-10 nm de espessura (Mann & Beckers, 2001). As proteínas que compõem esta rede, TgIMC 1 e 2, são similares às articulinas encontradas em euglena, assim como outra identificada com 42% de identidade e 55% de similaridade com articulinas de *Euglena gracilis*. Essa rede se estende de forma homogênea por todo o corpo do parasita, terminando em uma estrutura circular na extremidade posterior, denominada complexo basal, que contém proteínas como a TgMORN1, a TgCentrina 2 e a cadeia leve da dineína (Nishi *et al.*, 2008).

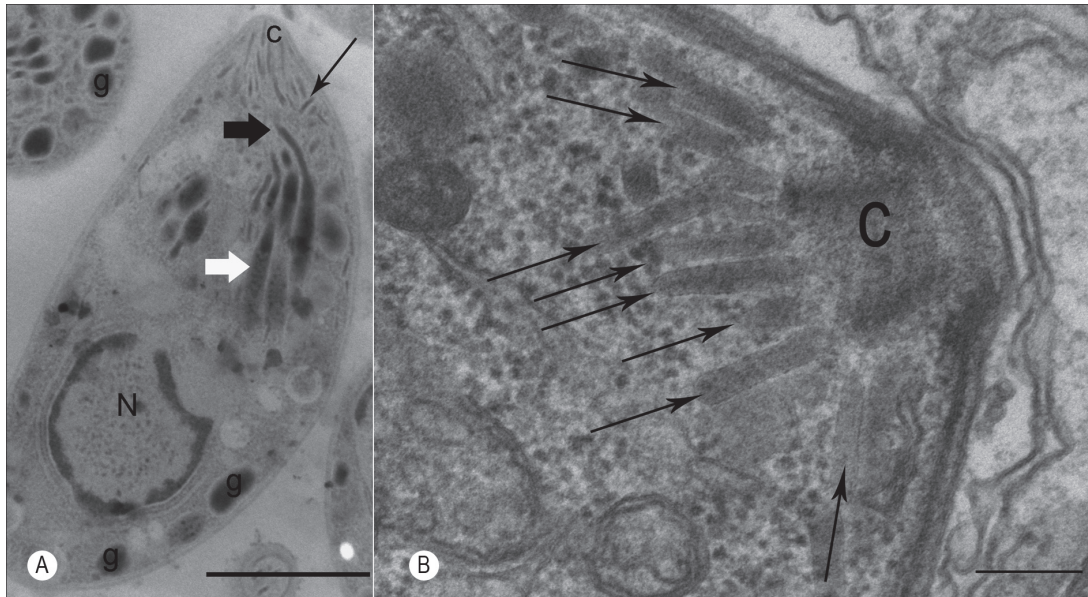
Organelas Secretórias Envolvidas na Entrada Ativa e no Estabelecimento do Vacúolo Parasitóforo

Certamente, o que há de mais característico em *T. gondii* é o seu complexo apical formado pelo conoide e por organelas secretórias especializadas, as róptrias e os micronemas.

Micronemas

Os micronemas são pequenas estruturas em forma de bastão medindo aproximadamente 50 nm x 250 nm. Estão presentes apenas na extremidade anterior do protozoário (Figuras 1 e 5). São limitados por uma unidade de membrana, e seu conteúdo é homogêneo e elétron-denso, quando observados em microscopia eletrônica. Este conteúdo é fortemente marcado quando se utiliza a técnica do ácido fosfotúngstico alcoólico, que detecta proteínas básicas (Figura 5-A). As proteínas micronemais são sintetizadas no retículo endoplasmático e possuem duas sequências conservadas de aminoácidos que são necessárias e suficientes para que sejam endereçadas para estas organelas. O primeiro motivo inclui a sequência de aminoácidos SYHYY. Sequências similares já foram descritas na cauda citoplasmática das proteínas micronemais de outros apicomplexos. A segunda sequência de endereçamento consiste em uma sequência de resíduos acídicos-EIEYE. Antes de chegarem aos micronemas, estas proteínas passam pelo complexo de Golgi e são glicosiladas. As proteínas micronemais são designadas MIC 1, 2 e assim sucessivamente, tendo sido identificadas até o momento 11 delas (Carruthers & Tomley, 2008). As proteínas dos micronemas contêm uma variedade de domínios adesivos, incluindo proteínas tipo-integrina (MIC2), as tipo-trombospondina (MIC 1 e 2), as tipo-EGF (fator de crescimento epidermal) (MIC 6, 7, 8 e 9) e as tipo-lectina (MIC3 e MIC 8), que medeiam interações com componentes da superfície da célula hospedeira, inclusive o deslizamento ou *gliding*. Algumas dessas proteínas estão envolvidas no processo de

adesão do protozoário à superfície da célula hospedeira, funcionando como adesinas. A liberação do conteúdo dos micronemas é um processo dependente e regulado por Ca^{2+} e ocorre nos momentos iniciais do processo de interação com a célula hospedeira (Lovett *et al.*, 2002). Além das MICs, outra importante proteína de micronema secretada nos momentos iniciais da entrada do parasita na célula hospedeira é AMA 1 (antígeno de membrana apical). Esta proteína participa da formação da junção móvel – uma junção do tipo ocludente em forma de anel – que se forma entre as membranas do parasita e da célula hospedeira no momento da entrada ativa e que seleciona as proteínas que serão excluídas do vacúolo parasitóforo em formação.

Figura 5 – Organelas secretórias de *Toxoplasma*

A – Pela técnica do ácido fosfotúngstico alcoólico, as regiões ricas em proteínas básicas, como núcleo (N), micronemas (seta fina) e grânulos densos (g) são evidenciadas. A região do pescoço das róptrias também fica bem elétron-densa (seta larga preta), enquanto a região do bulbo (seta larga branca) permanece pouco contrastada. O conoide é apontado por c. B – Micrografia eletrônica da região anterior de um taquizoíta de *Toxoplasma gondii* evidenciando a extremidade apical onde aparece o conoide (c) e vários micronemas, assinalados pelas setas. Barras: A – µm. B – 0,5 µm.

Róptrias

As róptrias são organelas maiores que os micronemas e em formato de clava, apresentando a região basal mais larga, com uma matriz com aspecto esponjoso e uma porção mais afilada, o pescoço, que converge para o interior do conoide (Figuras 1 e 5-A). Taquizoítas de *T. gondii* apresentam de sete a 14 róptrias. Estas organelas são delimitadas por uma unidade de membrana, possuem pH ácido e também contêm proteínas básicas. As proteínas das róptrias são sintetizadas no retículo endoplasmático e apresentam peptídeos sinal, em geral uma sequência YXXΦ e LL, passam pelo complexo de Golgi e posteriormente se acumulam nas róptrias (revisto em Sheiner & Soldati-Favre, 2008). Pelo menos 29 proteínas já tiveram sua localização confirmada nas róptrias. Destas, 24 estão localizadas na porção basal, chamada de bulbo, sendo denominadas ROPs, e cinco estão presentes no pescoço, sendo denominadas RONs.

A secreção do conteúdo destas organelas parece ser sequencial à secreção dos micronemas, sempre numa fase bem inicial do processo de invasão do parasita. Essa secreção consiste de ROP1, ROP2/3/4 e ROP18, em conjunto com a proteína de grânulo denso, GRA7, abordada adiante. Todas estas moléculas são encontradas em pequenas

vesículas ou em agregados dispostos em fileiras no citoplasma e no núcleo da célula hospedeira imediatamente antes da invasão parasitária e, após a invasão, no vácuolo parasitóforo. A maioria destas proteínas foi inicialmente descrita com o emprego de anticorpos monoclonais e, mais recentemente, por meio da análise proteômica de róptrias purificadas (Boothroyd & Dubremetz, 2008).

Grânulos Densos

Enquanto micronemas e róptrias secretam seu conteúdo durante os processos de adesão e invasão, um outro tipo de organela secretória, os grânulos densos, secretam seu conteúdo, majoritariamente, na fase intracelular do ciclo. Os grânulos densos estão distribuídos por todo o corpo do parasita e têm diâmetro médio de 0,2 μm (Figuras 1 e 5-A). A matriz da organela é uniformemente elétron-densa. Estudos da cinética de infecção de *T. gondii* em células hospedeiras demonstraram que o conteúdo dos grânulos densos é secretado principalmente nos primeiros momentos após a entrada do parasita e formação do vacúolo parasitóforo inicial localizando-se nos limites internos do vacúolo parasitóforo. Ao contrário das róptrias e dos micronemas, que secretam seu conteúdo através do polo apical, a secreção dos grânulos densos ocorre nas regiões lateral e posterior do corpo do parasita. Uma vez secretadas, as GRAs (proteínas localizadas em grânulos densos) serão encontradas na membrana do vacúolo parasitóforo e na rede intravacuolar, uma rede de nanotúbulos de 60-90 nm de diâmetro que interconecta os parasitas entre si e com a membrana do vacúolo parasitóforo. Enquanto GRA3, GRA5, GRA7 e GRA8 são incorporadas à membrana do vacúolo parasitóforo, GRA2, GRA4 e GRA6 formam um complexo que interage e estabiliza as membranas da rede intravacuolar (Mercier *et al.*, 2005).

Endomembranas

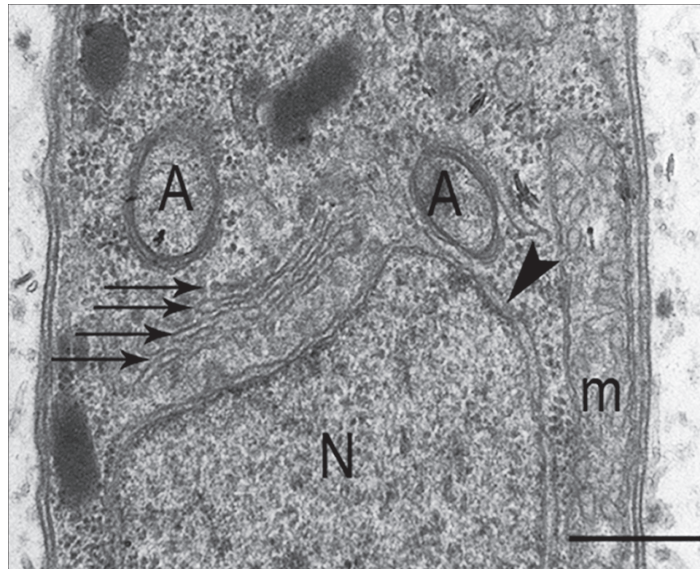
A rede endomembranária de *T. gondii* é composta por um único retículo endoplasmático (RE) e um único complexo de Golgi (Figura 6). O RE está localizado na área perinuclear, como parte do envoltório nuclear, dali se ramificando na direção da película. O RE perinuclear é um compartimento intermediário obrigatório para a translocação entre o RE e o Golgi. O complexo de Golgi é formado por três a cinco cisternas localizadas na região anterior ao envoltório nuclear, adjacente ao RE (Joiner & Roos, 2002). Considerando que é a partir desta via – retículo endoplasmático/complexo de Golgi – que são direcionados os componentes das três organelas secretoras (micronemas, róptrias e grânulos densos), esta constitui uma via secretória de intenso tráfego (Sheiner & Soldati-Favre, 2008).

A existência de um sistema lisossomal clássico não está estabelecida, já que até o momento não foi identificado equivalente morfológico de lisossomos secundários em *T. gondii*. No entanto, algumas características das róptrias, tais como seu pH ácido e a presença de cisteína e serina-proteases, sugerem que estas organelas sejam equivalentes aos lisossomos. Também não foram identificados peroxissomos em *T. gondii*.

Organelas de Origem Endossimbiótica: mitocôndria e apicoplasto

Mitocôndria

Enquanto a maioria dos organismos pluricelulares apresenta um grande número de mitocôndrias, em *T. gondii* ela é única, longa e ramificada, conforme demonstrado tanto por imuno-histoquímica quanto por reconstrução tridimensional. Em cortes ultrafinos observa-se que a membrana interna da mitocôndria única de *T. gondii* possui um grande número de cristas tubulares que sofrem uma leve constrição na região de fusão à membrana interna (Figura 6). O genoma mitocondrial dos apicomplexos é o menor já descrito: 6 kb.

Figura 6 – Corte longitudinal de um taquizoíta

Destaca-se a estrutura da mitocôndria (m) com cristas típicas (bulbosas), as cisternas do complexo de Golgi (setas) sobre o núcleo (N) em forma de taça envolto pelo retículo endoplasmático (cabeça de seta). Dois perfis de apicoplasto (A) indicam que esta célula já está em processo de divisão. Barra de 0,5 μm.

A mitocôndria em *T. gondii* se cora com rodamina 123, o que demonstra a presença de um potencial de membrana ativo. Em estudos bioquímicos com taquizoítas extracelulares, observou-se o consumo de oxigênio na presença de diversos substratos e sua redução na presença de inibidores mitocondriais clássicos. No entanto, a participação da mitocôndria como geradora de energia para o parasita é controversa e ainda está sob investigação. Embora os taquizoítas possuam mitocôndrias com cristas tipicamente associadas com a respiração, a glicólise é a principal via de produção de energia. Além das atividades de fosforilação oxidativa, a mitocôndria de *T. gondii* também estaria envolvida na formação de complexos Fe-S, biossíntese de heme e pirimidina (Seeber, 2003).

Apicoplasto

Além da mitocôndria, os apicomplexos em geral e o *T. gondii* possuem entre si outra organela de origem simbiótica: o apicoplasto (Köhler *et al.*, 1997)

Está localizado na região anterior ao núcleo e adjacente ao complexo de Golgi (Figuras 1 e 6). Sua presença foi assinalada morfologicamente na década de 1960, sendo então denominado organela multimembranária. A sua delimitação por múltiplas membranas (quatro) poderia fornecer a primeira pista sobre sua origem, mas este detalhe passou despercebido por décadas. Somente na década de 1980, estudos com o DNA extracromossomial do *Plasmodium knowlesi* forneceram mais dados sobre a sua natureza. Além do DNA nuclear, foram encontrados outros dois: um de 35 kb e outro 6 kb. O DNA de 6 kb foi identificado como de origem mitocondrial, enquanto a análise do DNA de 35 kb revelou que este contém RNA polimerase semelhante à de cianobactérias, o que, sem dúvida, é uma característica de plastídeos. O genoma do plastídeo de *T. gondii* foi sequenciado por volta de 1997 (GenBank accession U87145) e mostrou ser similar tanto em organização quanto em conteúdo gênico ao encontrado em *Plasmodium falciparum* e em outras espécies de apicomplexos. Em estudos de hibridização *in situ* usando sondas em *T. gondii*, observou-se que o genoma de 35 kb residia na até então misteriosa organela multimembranária, localizada na região apical ao núcleo. A partir de então, esta organela passou a ser chamada apicoplasto (MacFadden *et al.*, 1996).

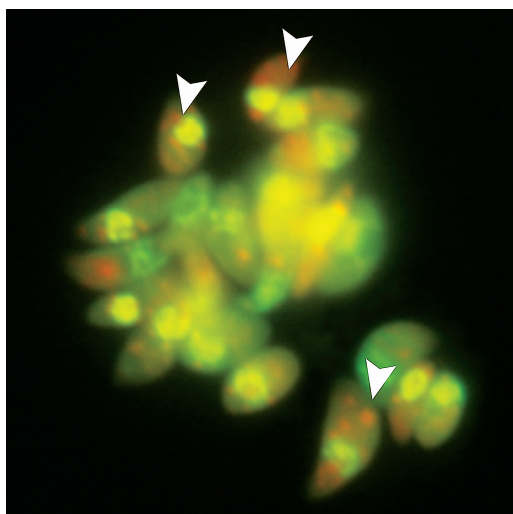
Em numerosas micrografias eletrônicas, detectou-se a presença de quatro membranas ao redor do apicoplasto. As duas membranas mais internas pertenceriam ao plastídeo original, a terceira membrana seria derivada da membrana externa da alga vermelha, e a mais externa corresponderia à membrana do vacúolo endocítico do ancestral Apicomplexa (Figuras 1 e 6). Outra semelhança com os plastídeos seria a presença de translocadores da membrana externa (TOC) e translocadores da membrana interna (TIC) do cloroplasto como facilitadores do transporte através das membranas. A presença de TOC em *T. gondii* ou em qualquer outro parasita não foi detectada, mas recentemente foi identificada a presença de um homólogo de TIC na membrana mais interna do apicoplasto em *T. gondii* (Van Dooren *et al.*, 2008).

Além das funções essenciais para sua manutenção, como síntese de DNA e proteínas, no apicoplasto também ocorrem vias metabólicas importantes como a biossíntese de ácidos graxos do tipo II, a síntese de isoprenoides, cujas enzimas são distintas da via do mevalonato encontrada em humanos, vias acessórias como sistema redox compreendida por ferredoxina-$NADP^+$ redutase e ferredoxina, ácido lipoico sintetase, síntese de agregados de Fe-S e algumas etapas da biossíntese do grupamento heme (Seeber, 2003).

Acidocalcissomos e Corpos Lipídicos

T. gondii ainda apresenta outras organelas importantes, como os acidocalcissomos e os corpos lipídicos.

Cerca de dez acidocalcissomos se encontram dispersos aleatoriamente no citoplasma do parasita. Estas organelas são limitadas por uma única unidade de membrana, e seu diâmetro varia de 40 nm a 150 nm (Figura 1). Incubadas com laranja de acridina (uma base fraca, fluorescente, que se acumula em compartimentos acídicos), estas estruturas fluorescem na cor laranja, quando visualizadas por microscopia de fluorescência, mostrando possuir natureza acídica (Figura 7). A microanálise de raios X na microscopia eletrônica mostra que a composição dos acidocalcissomos inclui cálcio, pirofosfato, polifosfato, magnésio, oxigênio, potássio, cloro e zinco. Além disso, na membrana dos acidocalcissomos existem uma Ca^{2+}-ATPase envolvida com influxo de Ca^{2+}, e duas bombas de prótons – uma H^+-ATPase vacuolar e H^+-pirofosfatase vacuolar –, que atuam na acidificação deste compartimento (revisto em Miranda *et al.*, 2008).

Figura 7 – Microscopia de fluorescência de taquizoítas de *Toxoplasma gondii* tratados com a sonda fluorescente laranja de acridina

Compartimentos acídicos, como os acidocalcissomos, aparecem em laranja (cabeças de seta).

Fonte: foto gentilmente cedida pelo dr. Kildare Miranda, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Os corpos lipídicos são gerados como parte do metabolismo geral do protozoário e podem representar uma forma de material de reserva a ser utilizado posteriormente. Trabalhos anteriores já mostraram que a atividade de enzimas envolvidas na síntese de lipídios de reserva como triacilgliceróis e ésteres de colesterol está relacionada com a síntese de corpos lipídicos em *T. gondii*.

O Núcleo e o Processo de Divisão Peculiar de *T. gondii*

O núcleo do toxoplasma não difere significativamente do de outras células eucariontes, sendo limitado por um duplo envoltório e abrigando um único nucléolo (Sheffield & Melton, 1968). Situa-se na porção média do corpo celular, no caso do taquizoíta, e mais posteriormente nos bradizoítas. O formato típico é esférico com uma leve depressão no lado voltado para a porção apical, sobre a qual se dispõem as cisternas do complexo de Golgi. Como em outras células eucariontes, a membrana externa do envoltório nuclear faz parte do retículo endoplasmático (Figuras 1 e 6).

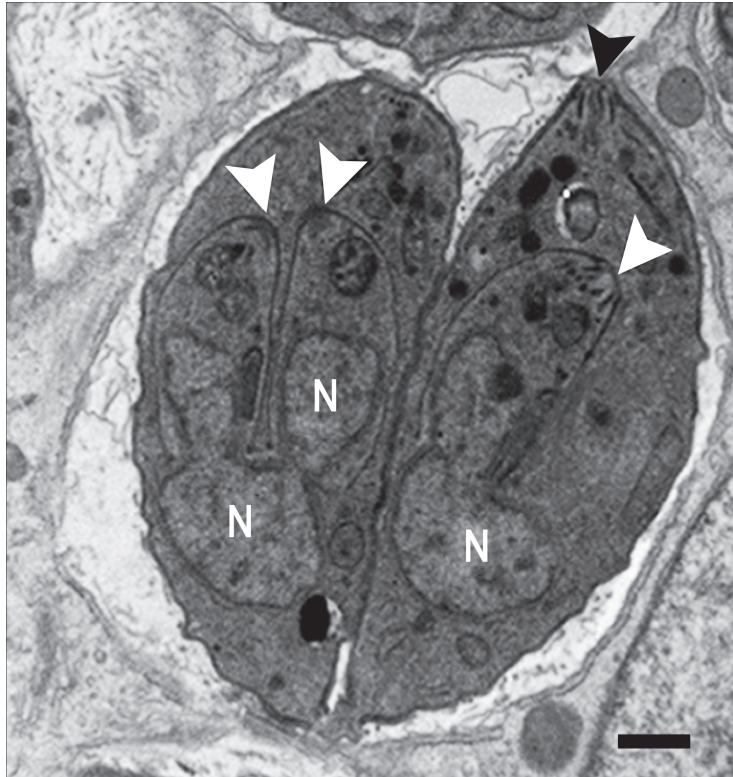
Uma vez estabelecida a infecção na célula hospedeira, *T. gondii* inicia um processo de divisão chamado de endodiogenia. Diferente dos processos clássicos de mitose e de esquizogonia observados em células animais, vegetais, fúngicas e procariotas, este apicomplexo é gerado dentro da célula-mãe. O tempo de geração varia conforme as características das cepas estudadas. A cepa RH, conhecida por sua capacidade de matar um camundongo em poucos dias, tem tempo de geração de seis horas.

A endodiogenia é uma forma especializada de reprodução na qual duas células-filhas são formadas no interior de uma célula-mãe, que se degenera ao fim do processo (Sheffield & Melton, 1968). Esta forma de divisão exclusiva ocorre durante a formação de taquizoítas e bradizoítas, e difere do processo que ocorre no hospedeiro definitivo ou no interior do oocisto.

Em *T. gondii* os centrossomos estão associados ao complexo de Golgi nos diferentes estágios do ciclo celular. Assim sendo, no início da divisão por endodiogenia já se observa o alongamento do complexo de Golgi e do apicoplasto, seguida da separação dos centrossomos e do complexo de Golgi. Em seguida, ocorre o aparecimento de dois novos complexos apicais rudimentares, consistindo em conoide, anéis apicais e no centro organizador de microtúbulos, que irão nuclear os microtúbulos subpeliculares e o complexo membranar interno. Essas estruturas membranárias começam a definir as células-filhas dentro do citoplasma da célula-mãe. Em *T. gondii* a divisão nuclear ocorre por uma endomitose fechada, ou seja, o envelope nuclear permanece intacto. Paralelamente ao surgimento dos complexos apicais das células-filhas, forma-se o centrocone, estrutura particular associada ao fuso intranuclear que promove a segregação do DNA duplicado entre as células-filhas. O centrocone, como o próprio nome sugere, tem o formato de um cone delineado pelo envoltório nuclear e se projeta através de uma abertura no envoltório na direção do citoplasma, onde se associa aos centrossomos citoplasmáticos. O núcleo assume um formato lobular, semelhante a uma ferradura, com a cromatina igualmente distribuída em direção aos polos opostos. À medida que o complexo interno de membranas associado aos microtúbulos se estende, engloba primeiramente os centríolos e o Golgi, e em seguida o apicoplasto, núcleo e RE já divididos. A partir deste ponto a célula-mãe torna-se mais esférica e um novo conjunto de organelas apicais (róptrias e micronemas) é formado nos dois polos anteriores das células-filhas nascentes (Figura 8).

A mitocôndria é a última organela a ser incorporada durante este processo. A replicação tanto do apicoplasto quanto da mitocôndria é dependente da divisão celular, ao contrário dos outros eucariotos cuja replicação de organelas de origem endossimbiótica é autônoma. Cada célula-filha continua a sua maturação até que o citoplasma e todo o seu

conteúdo estejam divididos entre as duas proles. Finalmente, o complexo interno de membrana da mãe desaparece e a membrana plasmática original é usada para envolver as duas células jovens. Uma clivagem iniciada no polo anterior estende-se através das células-filhas, restando ao fim somente um corpo residual na extremidade posterior pelo qual as células-filhas permanecem ligadas (Nishi *et al.*, 2008).

Figura 8 – Microscopia eletrônica de transmissão de um vacúolo parasitóforo contendo dois taquizoítas em processo de divisão por endodiogenia

São aparentes o núcleo em forma de ferradura (N) e os conoides de três das quatro células-filhas em formação (cabeças de setas brancas). O conoide de uma das células-mãe está assinalado pela cabeça de seta preta. Barra de 0,5 μm.

Os parasitas resultantes das sucessivas divisões celulares permanecem ligados a um único corpo residual, o que lhes dá um aspecto de roseta dentro do vacúolo parasitóforo. No egresso, estas rosetas se desfazem e os parasitas individualizados abandonam e terminam por lisar a célula hospedeira (Souza, DaMatta & Attias, 2009)

As organelas secretórias, como róptrias, micronemas e grânulos densos se formam *de novo* durante o processo de brotamento e antes que o núcleo se divida. Uma proteína chamada DrpB (proteína B relacionada à dinamina) está diretamente envolvida na formação de vesículas que participam da via de secreção regulada, que endereça às organelas apicais. A ausência desta proteína faz que as proteínas de róptrias e micronemas sigam a via de secreção constitutiva.

COMPARAÇÃO MORFOLÓGICA DAS TRÊS FORMAS INFECTIVAS PARA O HOMEM

Os três estágios evolutivos de *T. gondii* capazes de iniciar uma infecção no homem são os bradizoítas dos cistos presentes em carne malcozida, os esporozoítas de oocistos esporulados liberados nas fezes de gatos infectados e

os taquizoítas, capazes de atravessar a placenta ou ser transmitidos durante transfusão de sangue e transplante de órgãos. Estas formas diferem basicamente na localização do núcleo, no número de organelas apicais, na forma, número e elétron-densidade das róptrias, e na capacidade de armazenar energia na forma de grânulos de amilopectina.

O núcleo dos taquizoítas se localiza na parte central do corpo do parasita, enquanto em bradizoítas e esporozoítas ele aparece na região basal. Outra diferença marcante entre os estágios é a presença de numerosos micronemas em bradizoítas e esporozoítas em comparação com os taquizoítas. Em relação aos grânulos densos, observa-se um número maior em taquizoítas e esporozoítas que em bradizoítas. Já as róptrias aparecem em número semelhante (de sete a 14) em todas as formas. Porém, as róptrias de taquizoítas e esporozoítas são mais alongadas e seu conteúdo tem aspecto lacunoso, lembrando uma colmeia. Já nos bradizoítas as róptrias são mais largas na parte do bulbo e seu conteúdo é mais compacto e elétron-denso.

Outra diferença entre estas formas é a presença de grânulos de amilopectina, presentes em grande quantidade em bradizoítas e esporozoítas. Estes grânulos são ovoides (180 nm a 250 nm) e elétron-lucentes nas preparações convencionais para observação em microscopia eletrônica de transmissão. Aparecem distribuídos por todo o citoplasma ou agrupados, e têm natureza bioquímica semelhante ao amido (Coppin *et al*., 2003). Acredita-se que serviriam de reserva energética a estas formas que têm por característica permanecer viáveis por longos períodos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aperfeiçoamento e o surgimento de novas tecnologias têm contribuído para o melhor conhecimento da ultraestrutura de *T. gondii*, permitindo a correlação entre forma e função. Da descrição inicial de Nicolle e Manceaux (1908), na Tunísia, e de Alfonso Splendore (1908), no Brasil, cerca de cem anos atrás, até nossos dias, várias questões importantes sobre a estrutura e a biologia do toxoplasma foram sendo elucidadas graças a técnicas de microscopia eletrônica e óptica. Ainda assim, muitos aspectos ainda permanecem obscuros, como a localização precisa da rede subpelicular no sistema película-microtúbulos; a dinâmica de secreção dos micronemas; a possível existência de uma associação entre envoltório nuclear-retículo endoplasmático-apicoplasto; o modo pelo qual os grânulos densos dão origem à rede intravacuolar, além de outros aspectos do ciclo intracelular de *T. gondii*. A partir destas informações e de sua associação a dados moleculares e bioquímicos, será possível entender cada vez melhor a organização morfofuncional deste intrigante organismo e desenvolver novas terapias de combate a este parasita e à toxoplasmose, doença causada por ele.

REFERÊNCIAS

ATTIAS, M. & SOUZA, W. A review of the Apicomplexa cytoskeleton. *Trends in Molecular and Cell Biology*, 4: 67-79, 2009.

BOOTHROYD, J. C. & DUBREMETZ, J. F. Kiss and Spit: the dual roles of *Toxoplasma gondii*. *Nature Reviews Microbiology*, 6: 79-88, 2008.

CARRUTHERS, V. B. & TOMLEY, F. M. Microneme proteins in apicomplexans. *Subcellular Biochemistry*, 47: 33-45, 2008.

COPPIN, A. *et al.* Developmentally regulated biosynthesis of carbohydrate and storage polysaccharide during differentiation and tissue cyst formation in *Toxoplasma gondii*. *Biochimie*, 85: 353-361, 2003.

DAHER, W. & SOLDATI-FAVRE, D. Mechanisms controlling glideosome function in apicomplexans. *Current Opinion in Microbiology*, 12: 408-414, 2009.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. & SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clinical Microbiology Reviews*, 11: 267-299, 1998.

HU, K.; ROOS, D. & MURRAY, J. M. A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Biology*, 156: 1.039-1.050, 2002.

JOINER, K. A. & ROOS, D. S. Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *Journal of Cell Biology*, 157: 557-563, 2002.

KÖHLER, S. *et al.* A plastid of probable green alga origin in Apicomplexa parasites. *Science*, 275: 1.485-1.491, 1997.

LOVETT, J. L. *et al. Toxoplasma gondii* microneme secretion involves intracellular Ca(2+) release from inositol 1,4,5-triphosphate (IP(3))/ryanodine-sensitive stores. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 25.870-25.876, 2002.

MANN, T. & BECKERS, C. Characterization of the subpellicular network, a filamentous membrane skeletal component in the parasite *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 115: 257-268, 2001.

MCFADDEN, G. I. *et al.* Plastid in human parasites. *Nature*, 381: 482, 1996

MERCIER, C. *et al.* Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *International Journal of Parasitology*, 35: 829-849, 2005.

MIRANDA, K. *et al.* Acidocalcisomes in Apicomplexan parasites. *Experimental Parasitology*, 118: 2-9, 2008.

MORRISSETTE, N. S.; MURRAY, J. M. & ROOS, D. S. Subpellicular microtubules associate with an intramembranous particle lattice in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Science*, 110: 35-42, 1997.

NICOLLE, C. & MANCEAUX, L. Sur une infection a corps de Leishman (ou organisms voisins) du gondi. *Comptes Rendues de l'Academie des Sciences*, 147: 763, 1908.

NISHI, M. *et al.* Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Cell Science*, 121: 1.559-1.568, 2008.

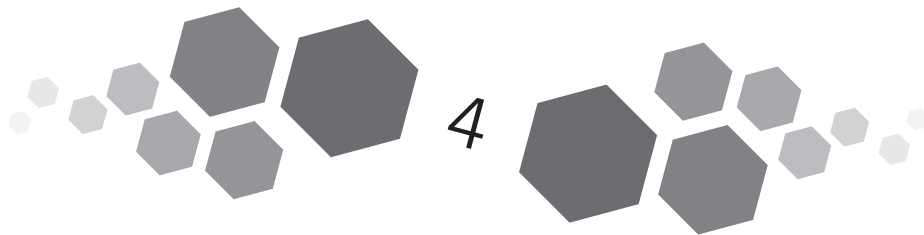
SEEBER, F. Biosynthetic pathways of plastid-derived organelles as potential drug targets against parasitic apicomplexa. *Current Drug Targets- Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, 3: 99-109, 2003.

SHEFFIELD, H. G. & MELTON, M. L. The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii. Journal of Parasitology*, 54: 209-226, 1968.

SHEINER, L. & SOLDATI-FAVRE, D. Protein trafficking inside *Toxoplasma gondii. Traffic*, 9: 636-646, 2008.

SOUZA, W.; DAMATTA, R. A. & ATTIAS, M. Brazilian contribution for a better knowledge on the biology of *Toxoplasma gondii*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 149-154, 2009.

SPLENDORE, A. Um nuovo protozoa parassita dei conigli incontrato ponti il kala-azar delluomo. *Revista da Sociedade Scientifica de São Paulo*, 3: 109-112, 1908.

VAN DOOREN, G. G. *et al. Toxoplasma gondii* Tic20 is essential for apicoplast protein import. *Proceedings of the National Academy of Sciences* USA, 105: 13.574-13.579, 2008.

4
Aspectos Bioquímicos

Wanderley de Souza

Inicialmente, cabe registrar a dificuldade de estudar aspectos bioquímicos de um microrganismo intracelular do qual nem sempre se pode obter um número grande de células para realização dos experimentos. Nesses casos, os resultados obtidos devem sempre levar em consideração a possibilidade de se estarem analisando restos de outras estruturas e organelas provenientes da célula hospedeira. Felizmente, nos últimos anos duas abordagens surgiram e vêm facilitando significativamente o estudo do metabolismo de protozoários intracelulares. Primeiro, o uso de marcadores fluorescentes que permitem avaliar vários aspectos da fisiologia celular com o uso de técnicas microscópicas e espectroscópicas. Segundo, o sequenciamento do genoma destes microrganismos, que permite prever a existência de determinadas proteínas, muitas das quais com função enzimática, possibilitando a constatação, ainda que indireta, da existência de alguns ciclos metabólicos ou algumas sequências metabólicas. Todo o arsenal de técnicas de análise pós-genômica pode então ser empregado a fim de comprovar as previsões oriundas da análise genômica. Utilizando estas e outras abordagens, tem sido possível obter informações crescentes sobre o metabolismo de membros do grupo Apicomplexa em geral e de *Toxoplasma gondii* em particular.

Neste capítulo abordaremos de forma sumária os aspectos metabólicos mais relevantes, ao passo que algumas informações suplementares estão distribuídas em vários capítulos deste livro.

MITOCÔNDRIA

A presença de uma mitocôndria típica do ponto de vista morfológico é conhecida desde os primeiros estudos por microscopia. Ela é única e ramificada por todo o corpo do taquizoíta e contém cristas do tipo tubular. Possui um genoma próprio que, à semelhança do que ocorre com outras células eucarióticas, codifica algumas enzimas. O genoma mitocondrial de Apicomplexa está entre os menores que se conhecem (cerca de 6 kb em contraste com 16 kb em mamíferos). Contém sequências curtas equivalentes às subunidades menor e maior de rRNA. No entanto, estas sequências não são contínuas, mas fragmentadas e espalhadas por todo o genoma.

Os dados disponíveis indicam que a mitocôndria de *T. gondii* é funcional. É claramente marcada quando o protozoário é incubado na presença de rodamina 123, um composto fluorescente acumulado em organelas que apresentam potencial transmembrana. A análise do consumo de oxigênio em células permeabilizadas com digitonina e incubadas na presença de alguns inibidores mostra sensibilidade parcial a estes inibidores (rotenona, por exemplo), indicando a presença de complexo III (citocromo e oxidorredutase) e IV (citocromo e oxidase). A oligomicina, que interfere na atividade da FoF1 ATP sintetase, inibe parcialmente o consumo de oxigênio. No conjunto, os dados disponíveis indicam que *T. gondii* apresenta uma mitocôndria funcional cuja atividade pode variar de acordo com o estágio evolutivo (Moreno *et al.*, 2007).

APICOPLASTO

Certamente a identificação da presença do apicoplasto em membros do grupo Apicomplexa pode ser considerada um dos mais importantes avanços neste campo nos últimos anos. Os dados disponíveis mostram a presença de um DNA circular com diâmetro de 23 μm e cerca de 35 kb (lembrando que o DNA do cloroplasto é de cerca de 70 kb) em uma organela delimitada por quatro unidades de membrana e localizada na região anterior da forma taquizoítica, próximo ao núcleo e ao complexo de Golgi. O genoma codifica para vários componentes necessários para a expressão do próprio genoma, como tRNAs envolvidos na síntese de proteínas do apicoplasto, proteínas ribossomais, entre outras importantes para a maquinaria envolvida nos processos de replicação, transcrição e síntese de proteínas e três subunidades do complexo de RNA polimerase (Feagin & Parsons, 2007).

Grande parte da atividade metabólica do apicoplasto depende de proteínas codificadas por genes localizados no núcleo, sintetizadas seguindo a rota secretória e transportada para o apicoplasto mediante a participação de uma sequência sinal. O peptídeo sinalizador varia em comprimento – entre 50 e 200 aminoácidos – e também na sua sequência. Existem duas hipóteses principais para explicar o processo de inserção das proteínas no apicoplasto. A primeira considera que o apicoplasto está conectado ao sistema secretório via membrana externa. A segunda considera que vesículas formadas no retículo endoplasmático ou no complexo de Golgi se fundem à membrana do apicoplasto. Certamente muitas proteínas não passam pelo complexo de Golgi, já que seu tráfego para o apicoplasto não é modificado quando o protozoário é tratado com brefeldina A, que inibe o tráfego no complexo de Golgi.

Por conterem todo um sistema envolvido em processos de replicação, transcrição e tradução do DNA e na síntese de proteínas, algumas drogas que interferem nestes processos têm sido utilizadas com algum sucesso na quimioterapia para a toxoplasmose. É o caso, por exemplo, dos antibióticos rifampicina, que inibe a RNA polimerase, clindomicina, que inibe o processo de tradução, e algumas drogas que inibem a DNA girase.

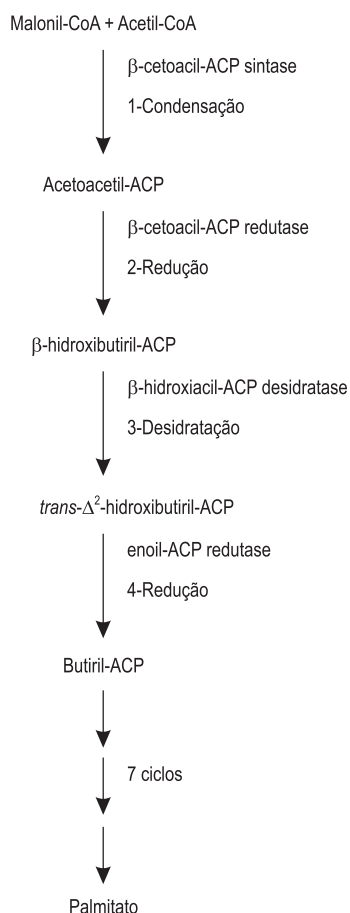
Um grande avanço na área metabólica ocorreu com a identificação de alguns ciclos metabólicos que ocorrem total ou parcialmente no apicoplasto. Entre estes ciclos, merece destaque o processo de síntese de ácidos graxos, a síntese de isoprenoides e a formação do *cluster* ferro-enxofre. Nestes processos, há uma importante interação entre o apicoplasto e a mitocôndria.

O processo de biossíntese de ácidos graxos em *T. gondii* é do tipo II, também encontrado em algas e plantas e que se caracteriza pela participação de várias enzimas isoladas. No caso de mamíferos, o processo de síntese, conhecido como do tipo I, é mediado por um complexo macromolecular com multidomínios. É provável que o protozoário também incorpore ácidos graxos do meio intracelular em que vive e use o processo do tipo I para a síntese de ácidos graxos. No entanto, o processo do tipo II é absolutamente essencial para a sobrevivência do parasita. É importante ressaltar que os ácidos graxos são necessários para a formação da bicamada de fosfolipídios que constitui a estrutura básica das membranas biológicas. A Figura 1 mostra uma visão geral do processo, em que o primeiro passo na formação

da cadeia do ácido graxo é a condensação dos grupos ativados acetil e malonil pela ação da β-cetoacil-ACP sintetase (KASI/II) para formar um grupo acetoacetil-ACP. Este, por sua vez, sofre redução do grupo carbonila em C-3 para formar D-β-hidroxibutiril-ACP. Essa reação é catalisada pela β-cetoacil-ACP redutase (KAR) e o doador de elétrons é o NADPH. No terceiro passo, ocorre a desidratação do D-β-hidroxibutiril-ACP a *trans*-Δ^2-butenoil ACP pela β-hidroxiacil-ACP desidratase (HAD). E, finalmente, a redução para formar butiril-ACP pela ação da enoil ACp redutase, tendo de novo o NADPH como doador de elétrons. As reações FAS são repetidas até formar o palmitato (Tarun, Vaughan & Kappe, 2009).

Genes que codificam para piruvato desidrogenase foram encontrados em *T. gondii*. Essa enzima participa do processo de formação de acetil-coenzima A (acetil-CoA) a partir de piruvato. A acetil-CoA carboxilase (ACC) é uma enzima importante do processo e é sensível a herbicidas do tipo ariloxifenolxipropionato. *T. gondii* apresenta duas ACCs. Uma é citosólica e a outra está localizada no apicoplasto. Enoil-ACP-CoA redutase também desempenha um papel importante e pode ser inibida por triclosan, o que leva à destruição do protozoário.

É também importante lembrar que a síntese de ácidos graxos do tipo II é importante na síntese de ácido lipoico, um cofator essencial para a atuação de descarboxilases oxidativas localizadas na mitocôndria e da piruvato desidrogenase, que ocorre no apicoplasto. A biossíntese de ácido lipoico ocorre no apicoplasto.

Figura 1 – Etapas do processo de biossíntese de ácidos graxos do tipo II

A síntese de isoprenoide é outro processo bioquímico que ocorre no apicoplasto. No caso de *T. gondii*, este processo não segue a via clássica do mevalonato, como ocorre em mamíferos. O parasita utiliza a via DOXP, tendo 1-desoxi-D-xilose-5-fosfato como composto intermediário. A DOXP redutase é inibida pelo antibiótico fosmidomicina.

Nos dados obtidos, observa-se também que o apicoplasto é o sítio da síntese de *clusters* de Fe-S, que desempenha papel importante no funcionamento de várias proteínas, sobretudo facilitando a transferência de elétrons. No processo de formação de Fe-S há inicialmente a geração de enxofre (S) a partir de cisteína em um processo em que há a participação da cisteína dessulfurase, com subsequente redução acoplada à oxidação do ferro (Fe) em uma porção específica da proteína.

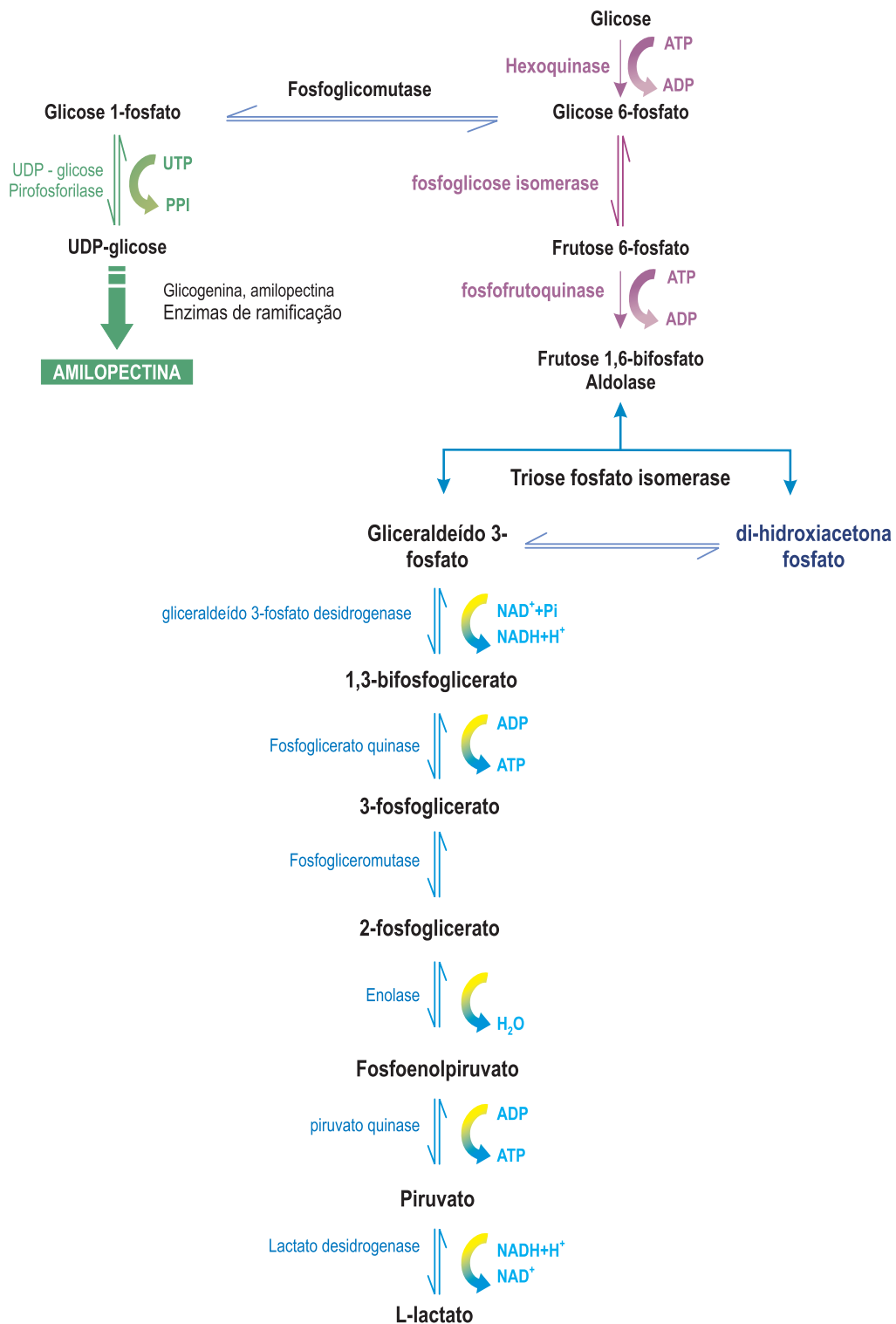
A síntese do grupo heme ocorre graças a uma estreita cooperação entre o apicoplasto e a mitocôndria. Genes codificadores para todas as oito enzimas, necessárias para a síntese *de novo* do grupo heme, são encontrados no genoma de *T. gondii*. A primeira enzima (ácido δ-aminolevulínico sintetase) é mitocondrial, enquanto as duas subsequentes (porfobilinogênio sintetase e hidroximetilbilano sintetase) estão no apicoplasto. Porfibilogênio desaminase e uroporfirinogênio descarboxilase provavelmente estão na mitocôndria, embora ainda não se possa excluir a possibilidade de que a última também se localize no apicoplasto. A ferroquelatase, última enzima da via, parece estar localizada na mitocôndria.

ACIDOCALCISSOMO

Como descrito no capítulo 3, *T. gondii* contém o acidocalcissomo, organela envolvida em várias funções relacionadas com o controle da concentração de diferentes íons. Em estudos por microscopia eletrônica, observa-se que esta organela é elétron-densa, contendo cálcio, fósforo, oxigênio, sódio, magnésio e zinco. Por outro lado, estudos bioquímicos, imunocitoquímicos e moleculares mostraram a presença de uma H^+-ATPase vacuolar, uma H^+-pirofosfatase vacuolar e uma Ca^{2+}-ATPase na membrana do acidocalcissomo. Outros transportadores também estão presentes na membrana. As concentrações de cálcio e fósforo são muito altas e há a formação de polifosfatos de cadeias curta e longa. Os níveis do polifosfato reduzem quando o parasita é submetido a condições em que há mobilização de cálcio, como é o caso de tratamento com ionóforos de cálcio, inibidores da H^+-ATPase ou alcalinização do meio. O controle dos níveis citoplasmáticos de cálcio em *T. gondii* é extremamente importante para vários processos fisiológicos como motilidade, extrusão do conoide, secreção do conteúdo dos micronemas e egresso dos taquizoítas da célula hospedeira no final do ciclo intracelular (Moreno *et al.*, 2007).

GLICÓLISE

Muito da atividade energética de *T. gondii* depende da produção de ATP e vários compostos intermediários a partir de um processo glicolítico clássico. Uma particularidade especial, que será descrita a seguir, é a capacidade da forma bradizoítica de produzir uma estrutura contendo uma reserva de polissacarídeos chamada de amilopectina. A Figura 2 mostra de forma esquemática a via glicolítica e sua conexão com a síntese de amilopectina. Os genes codificadores para as várias enzimas da via estão presentes no genoma, e a expressão de muitas delas já foi comprovada. No caso da desidrogenase lática foram encontrados dois genes, sendo um específico para a forma taquizoítica (LDH1) e outro para a forma bradizoítica (LDH2). Demonstrou-se que gossipol e uma iminolactona gossílica (que inibe a desidrogenase lática) inibem a proliferação intracelular de *T. gondii*, sendo que a LDH2 é mais sensível a estes inibidores.

Figura 2 – Via glicolítica em *T. gondii* e sua relação com a síntese de amilopectina

A atividade de glicose-6-fosfato isomerase é significativamente maior na forma bradizoítica. Uma outra enzima importante é a enolase que catalisa a conversão de 2-fosfoglicerol para fosfoenolpiruvato. Dois genes localizados no mesmo cromossomo codificam para esta proteína, que aparentemente apresenta múltiplas funções. A maior atividade é a da ENO 1 encontrada na forma bradizoítica. A forma ENO 2 é encontrada no taquizoíta. Tem sido mostrado (ver capítulo 3) que a enolase está também localizada no espaço entre a membrana plasmática e o complexo membranar interno, fazendo parte da maquinaria desenvolvida por membros do grupo Apicomplexa para sua motilidade pelo processo de deslizamento (*gliding*).

Neste contexto, a enolase promove a ligação de uma proteína micronemal relacionada com a trombospondina (um membro da família TRAP) e com o sistema actina-miosina. É importante assinalar que este sistema é fundamental para a sobrevivência do parasita, já que sua motilidade é indispensável para que se aproxime das células hospedeiras e possa então nelas penetrar.

AMILOPECTINA

A capacidade de produzir um polissacarídeo de reserva com características próprias é uma das propriedades de alguns membros do grupo Apicomplexa. Em mamíferos, e mesmo em muitos protozoários (*Giardia lamblia, Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*), há formação de partículas de glicogênio. Já em *T. gondii* e outros coccídeos, mas não em *Plasmodium*, *Babesia* e *Theileria*, há o processo de formação de uma estrutura que guarda alguma semelhança com o amido sintetizado pelas plantas e a amilose, encontrada nos cloroplastos. Tanto o glicogênio como a amilopectina são polímeros da glicose em ligação α (1---4), com ramificações em ligação α (1----6). O glicogênio é mais ramificado e mais compacto, e cada ramificação ocorre a cada conjunto de 8-12 moléculas de glicose. Já na amilopectina, as ramificações ocorrem a cada conjunto de 24-30 moléculas de glicose. O processo de síntese da amilopectina, mostrado na Figura 2, implica a participação de enzimas envolvidas nos processos (1) de síntese, (2) de ramificação da cadeia, (3) de desramificação da cadeia e (4) enzimas de degradação da amilopectina, como α-amilase, dicinase, fosforilase e α-glicosidase. Os dados disponíveis mostram certa semelhança com o processo de síntese de amido na alga *Chlamydomonas reinhardidtii* (Asai & Tomavo, 2007).

Todos os genes que codificam as enzimas envolvidas no processo de síntese de amilopectina em *T. gondii* são cópias únicas. Os genes são expressos sobretudo na forma bradizoítica. A amilopectina é consumida praticamente por completo durante o processo de transformação da forma bradizoíta em taquizoíta.

LIPÍDEOS

Ao falarmos do apicoplasto, abordamos o processo de síntese de ácidos graxos. Um componente altamente relevante em *T. gondii* é o processo de síntese de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), utilizado para a ancoragem da grande maioria das proteínas de membrana do protozoário. A âncora de GPI em *T. gondii* contém um núcleo GPI que é altamente conservado, etanolamina-PO4-6Manα1-2Manα1-6Manα1-4Glcα1-6-inositol. Como em mamíferos, existe o glicolipídeo precursor, que é então transferido em bloco para a proteína de membrana nascente.

BIOSSÍNTESE DE NUCLEOTÍDEOS

O processo de síntese dos componentes básicos que permitem a formação do DNA e do RNA de *T. gondii* tem sido estudado com alguma intensidade.

No caso da síntese de pirimidina, tanto a via conhecida como *de novo* como a *de salvação* foram observadas, sendo a primeira mais importante. A via de síntese *de novo* envolve a participação de seis enzimas. Algumas destas enzimas mostram diferenças com as encontradas em mamíferos, abrindo perspectivas para o desenvolvimento de drogas antiparasitárias. Já a via de síntese *de salvação* conta com a participação de cinco enzimas. Embora seja importante, esta via não parece ser indispensável, já que mutantes deficientes em algumas das enzimas crescem normalmente em cultura de células.

A síntese de purina *de novo* não ocorre em *T. gondii*. Logo, o parasita depende da via *de salvação*.

NTPase

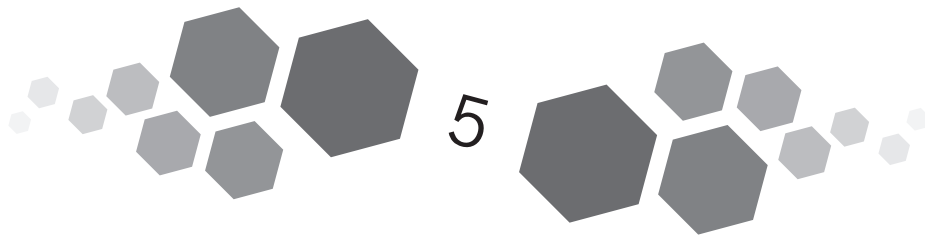
Uma característica única de *T. gondii* é contar com uma nucleotídeo fosfatase hidrolase (NTPase) encontrado em abundância na superfície da forma taquizoítica. Esta proteína, que guarda certa semelhança com as ecto-ATPases, é secretada quando o protozoário se encontra no interior do vacúolo parasitóforo da célula hospedeira, associando-se com a rede intravacuolar descrita no capítulo 5. As cepas de *T. gondii* do tipo I contêm duas isoformas de NTPases, conhecidas como NTPases I e II. A NTPase II está presente em todas as cepas. Os dados disponíveis indicam que a presença de uma NTPase é fundamental para a sobrevivência de *T. gondii*.

REFERÊNCIAS

ASAI, T. & TOMAVO, S. Biochemistry and metabolism of *Toxoplasma gondii*. *In*: WEISS, L. M. & KIM, K. Toxoplasma gondii: *the model Apicomplexan-perspectives and methods*. New York: Elsevier, Academic Press, 2007.

FEAGIN, J. E. & PARSONS, M. The apicoplast and mitochondrion of *Toxoplasma gondii*. *In*: WEISS, L. M. & KIM, K. *Toxoplasma gondii*: the model Apicomplexan-perspectives and methods. New York: Elsevier, Academic Press, 2007.

MORENO, S. N. J. *et al*. Calcium storage and homeostasis in *Toxoplasma gondii*. *In*: WEISS, L. M. & KIM, K. *Toxoplasma gondii*: the model Apicomplexan-perspectives and methods. New York: Elsevier, Academic Press, 2007.

TARUN, A. T.; VAUGHAN, A. M. & KAPPE, S. H. I. Redefining the role of *de novo* fatty acid synthesis in Plasmodium parasites. *Trends in Parasitology*, 25: 545-550, 2009.

A Interação de *Toxoplasma gondii* com a Célula Hospedeira

Rossiane Claudia Vommaro • Márcia Attias • Wanderley de Souza

Toxoplasma gondii é capaz de invadir e se multiplicar em virtualmente qualquer célula nucleada de qualquer espécie animal de sangue quente (mamíferos e aves). Esta natureza cosmopolita por si só já o torna um parasita notável. Além disso, a virulência da infecção nos hospedeiros imunocompetentes é, na maior parte dos casos, branda e seguida de uma fase crônica assintomática, embora não haja cura parasitológica. A patogênese da toxoplasmose também é influenciada pelo tipo de cepa do parasita. Assim, ele pode estabelecer com o sistema imunológico do hospedeiro um equilíbrio que permite a sobrevivência de ambos.

Na fase aguda, formas taquizoítas do *T. gondii* se multiplicam rápida e sucessivamente em diferentes células hospedeiras nucleadas, disseminando-se por vários tecidos. Após a ativação do sistema imunológico, estas formas se diferenciam em bradizoítas, que darão origem aos cistos teciduais, estabelecendo assim a fase crônica da infecção. O processo de interação com as células hospedeiras pode ser subdividido, para fins de estudo, em quatro etapas: reconhecimento/adesão, invasão, desenvolvimento (multiplicação) intracelular e egresso.

TROPISMO PELAS CÉLULAS HOSPEDEIRAS

Mesmo sendo capaz de infectar virtualmente qualquer célula nucleada, os macrófagos são alvos importantes nas primeiras etapas da infecção. O resultado do encontro do parasita com células fagocíticas profissionais é determinante para a sobrevivência ou morte do hospedeiro. A capacidade do parasita de ativar forte resposta imunomediada por célula é essencial à sobrevivência do hospedeiro e ao estabelecimento da infecção.

Apesar desse comportamento promíscuo em relação à invasão de qualquer tipo celular nucleado, *T. gondii* apresenta tropismo por certas células, como monócitos e células dendríticas, configurando uma estratégia de disseminação no hospedeiro.

Em estudos da fase inicial da infecção usando como modelo a inoculação intraperitonial de taquizoítas, observou-se que o alvo preferencial do parasita é uma população de monócitos CD68+. Porém, enquanto a cepa Me 49 (de baixa

letalidade em camundongos) faz o recrutamento dessas células na cavidade peritonial, a cepa RH (altamente letal para camundongos) parece recrutar um alto influxo de neutrófilos (Robben *et al*., 2005).

Outros estudos mostraram a importância das células dentríticas na fase inicial da disseminação. Camundongos inoculados com células dentríticas infectadas com *T. gondii* apresentaram um curso mais acelerado da disseminação da infecção, quando comparados a animais infectados com taquizoítas livres (Lambert *et al*., 2006). A entrada do protozoário pela via oral se inicia com a infecção no aparelho gástrico, passando para as células dendríticas CD 11c+ e monócitos/macrófagos CD11b+ na lâmina própria, placas de Peyer e nos linfonodos mesentéricos. No sangue periférico, apenas monócitos/macrófagos CD11b+ se encontram infectados.

Qualquer que seja a via de entrada e a forma infecciosa (oocistos, provenientes das fezes dos felídeos, bradizoítas de cistos teciduais ou taquizoítas), é nas células do tecido muscular esquelético e do sistema nervoso central (neurônios e glia) que se formam preferencialmente os cistos teciduais, onde os parasitas, na forma bradizoíta, sobrevivem a salvo do reconhecimento e destruição pelo sistema imunológico do hospedeiro.

DESLIZAMENTO, RECONHECIMENTO E ADESÃO

A adesão e o reconhecimento de moléculas de superfície entre o parasita e a futura célula hospedeira é a primeira fase do processo de invasão (Figura 1A, B). Nessa etapa, o parasita interage com a célula hospedeira mediante ligações de baixa afinidade com moléculas expostas constitutivamente na face externa da membrana do parasita, ancoradas a ela por glicosil-fosfatidil-inositol (GPI). Essas moléculas são as SAG (*surface antigens*), as SRS (*SAG related-sequence*) e as SUSAs (antígenos não relacionados à SAG) (revisto por Carruthers & Boothroyd, 2007). Uma dessas proteínas, a SAG3, é capaz de se ligar à heparina e outras glicosaminoglicanas (Carruthers *et al*., 2000; Ortega-Barria & Boothroyd, 1999). Também já foi mostrado que a laminina aumenta a adesão de taquizoítas a macrófagos *in vitro*, apontando para um possível papel de receptores de matriz extracelular na adesão deste parasita à célula hospedeira. Porém, proteínas denominadas de RON (2, 4 e 5), secretadas especificamente da região do pescoço das róptrias, formam um complexo localizado na membrana da célula hospedeira, onde RON 2 possui um ectodomínio. Este ectodomínio serviria como receptor para o próprio parasita. A ligação desse receptor com AMA 1, proteína secretada por micronemas ancorada na membrana do parasita, constituiria o mecanismo geral de reconhecimento para qualquer tipo celular a ser infectado por *T. gondii* (Tonkin *et al*., 2011).

A adesão do taquizoíta à superfície da célula hospedeira depende da secreção das proteínas dos micronemas (Figura 2A). Estas proteínas, denominadas MIC (proteínas que se localizam em micronemas), se incorporam à membrana plasmática de modo que sua porção N-terminal (citoplasmática) se conecta com filamentos de F-actina do parasita através de outra proteína, a aldolase. Estes microfilamentos, por sua vez, interagem com uma miosina, a TgMyoA, ligada ao complexo interno de membranas (CIM). A TgMyoA promove o deslocamento dos filamentos de actina para a parte posterior do parasita, o que acaba por deslocar também o complexo MIC-receptor que se encontra ligado a estes filamentos. Este processo resulta no deslizamento do parasita para a frente (revisto em Daher & Soldati-Favre, 2009).

Durante seu deslocamento, o parasita executa movimentos de torção e extensão do corpo celular, assim como projeta o conoide para fora de forma intermitente. Ainda não está estabelecida a relação entre a motilidade do conoide e a secreção dos micronemas.

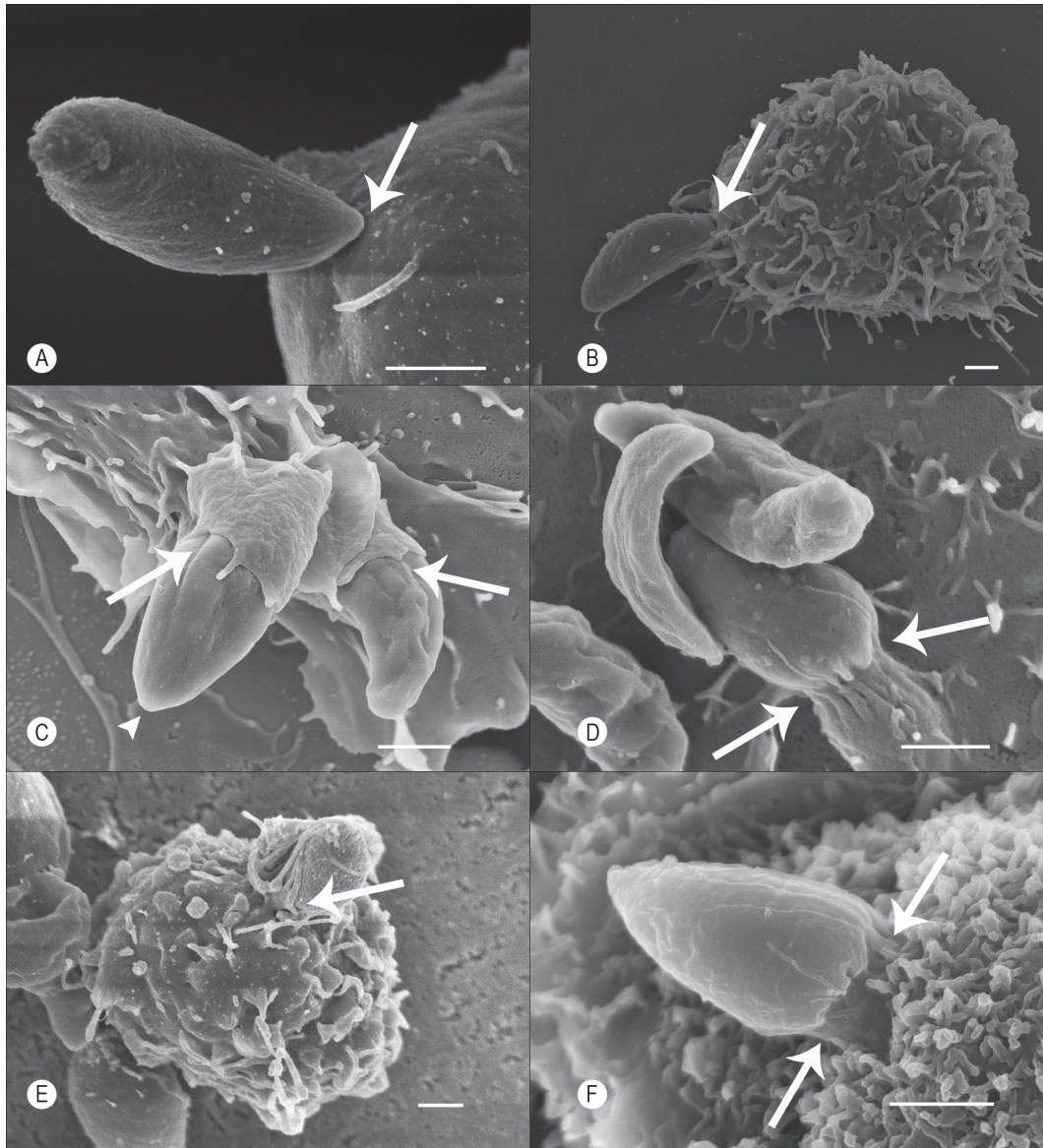
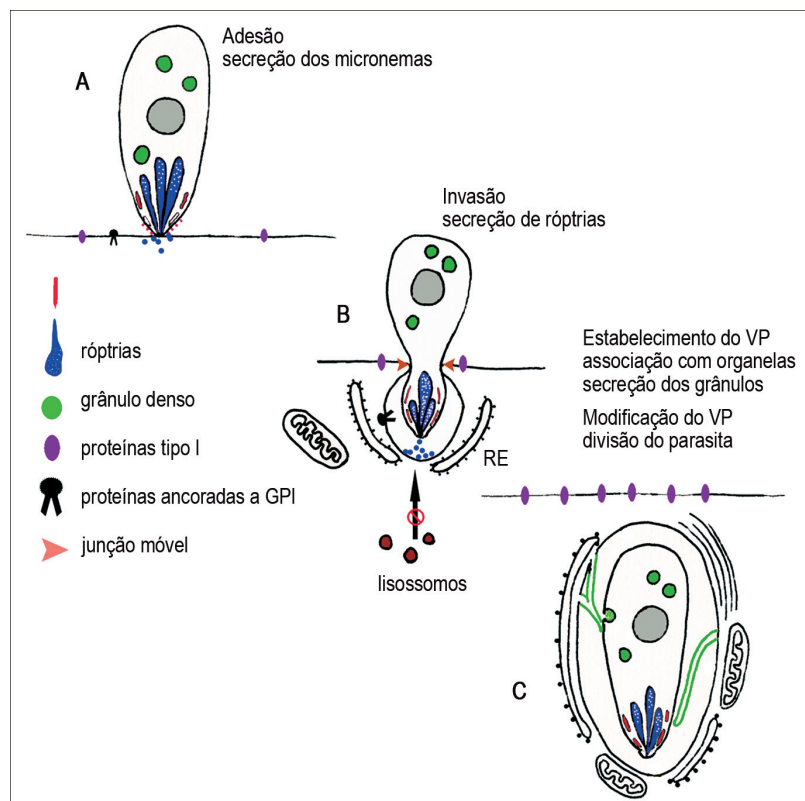
Figura 1 – Sequência de imagens em microscopia eletrônica de varredura da interação e desenvolvimento de *Toxoplasma gondii* em diferentes células de mamíferos: entrada

(A) Taquizoíta com o conoide protuberante (seta) aderido a uma célula em cultivo. (B) a (F) Aspectos da invasão da célula hospedeira. (B) A porção apical do parasita já não é visível. Expansões filiformes da membrana da célula hospedeira envolvem o parasita progressivamente, engolfando-o (setas). (C) Dois parasitas sendo internalizados por um macrófago através de expansões tubulares (setas). Em pelo menos um deles, o conoide, é visível (cabeça de seta), indicando que a invasão não é ativa neste caso. (D) Taquizoíta com metade do corpo celular já dentro da célula hospedeira. O estreitamento do corpo celular no ponto de passagem pela junção móvel (setas) confere ao parasita a forma de ampulheta. (E) Parasita quase completamente internalizado por uma célula fagocítica onde as expansões filiformes da membrana envolvem a porção ainda exterior do parasita (seta). (F) Toxoplasma penetrando uma célula epitelial em cultura. O estrangulamento na região da junção móvel é nítido (setas). Barras: 1 μm.

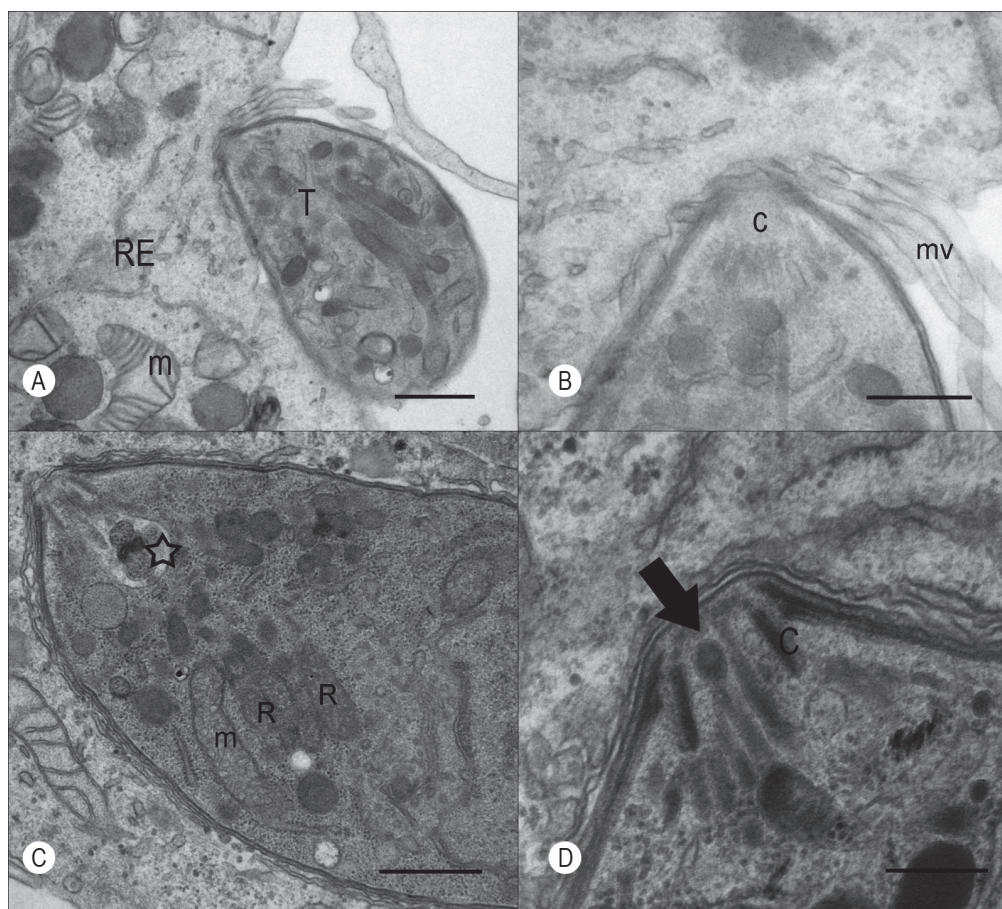
Figura 2 – Sequência das etapas da entrada ativa de *Toxoplasma gondii* e formação do vacúolo parasitóforo (VP)

(A) Adesão do parasita à membrana da célula hospedeira pelo polo apical. O parasita se posiciona perpendicularmente e secreta o conteúdo dos micronemas. (B) A efetiva entrada do parasita depende da secreção do conteúdo das róptrias. As proteínas das róptrias tanto participam da formação da junção móvel, vista como um estrangulamento do corpo do parasita, quanto da formação do vacúolo parasitóforo. A junção móvel forma uma barreira que exclui tanto proteínas da membrana da célula hospedeira quanto da membrana do parasita. O vacúolo parasitóforo se forma durante a entrada e conserva em sua membrana proteínas ancoradas a GPI. A fusão com o sistema endolisossomal é bloqueada neste processo ativo. (C) A associação com as organelas da célula hospedeira já é observada desde o início do estabelecimento do vacúolo, assim como a secreção de grânulos densos que dá origem à rede intravacuolar.

ENTRADA ATIVA

Ao penetrar na célula hospedeira, o parasita normalmente posiciona o polo apical perpendicularmente a esta (Figura 1A, B). Aparentemente, *T. gondii* não tem preferência por se ligar a nenhum subdomínio presente na membrana da célula hospedeira e nem há transferência de moléculas destes domínios para a membrana do vacúolo parasitóforo (Charron & Sibley, 2004). Esta ausência de subdomínios específicos para se ligar a uma célula reforça, como discutido anteriormente, que são utilizados receptores secretados pelo próprio parasita para o reconhecimento de qualquer tipo celular.

Os primeiros momentos da interação de *T. gondii* foram documentados em neutrófilos por meio da microscopia eletrônica de varredura, e três padrões morfológicos foram identificados: internalização do parasita acompanhada de emissão de filopódios por parte da célula hospedeira, formação de uma expansão tubular de membrana em torno do parasita e afundamento da membrana da célula hospedeira no ponto de entrada (MacLaren, Attias & Souza, 2004). Esses padrões morfológicos de interação das membranas no parasita com a membrana da célula hospedeira devem variar segundo o tipo celular envolvido na infecção (Figura 1B-F, Figura 3A-B).

A invasão da célula hospedeira tem início quando a secreção dos micronemas leva ao estabelecimento de um contato íntimo de *T. gondii* com a membrana desta. Nesse momento, uma interrupção transiente da integridade dessa membrana permite o influxo de íons ou moléculas do parasita para o interior da célula hospedeira. Esta permeabilidade foi demonstrada em experimentos de *patch clamp*, nos quais se detecta um pico de menos de 1 segundo na condutividade elétrica da membrana da célula-alvo. A comunicação para passagem de moléculas entre o parasita e a célula-alvo também foi demonstrada por Dubremetz (2007) em réplicas de criofratura onde foi observado um poro entre a membrana do parasita e do vacúolo parasitóforo, durante os primeiros momentos da penetração. Além disso, acredita-se que a extrusão do conoide – estrutura em forma de cone com capacidade de expansão e retração – seja necessária para o processo de invasão.

Figura 3– Aspectos da entrada de *Toxoplasma gondii* observados em microscopia eletrônica de transmissão

(A) Corte espesso onde se observa a íntima relação entre a extremidade apical do parasita e a membrana da célula hospedeira. (B) Maior aumento da região de contato entre o parasita e a célula hospedeira. Notar as microvilosidades (mv) semelhantes às observadas na Figura 1 (B e C). (C) O parasita observado já está completamente internalizado. A estrela aponta para uma róptria (R) recém-esvaziada. Observe-se a mitocôndria (m). (D) Região apical de um taquizoíta em processo de invasão. Através do conoide (c) são secretados produtos das róptrias (seta), essenciais para o processo. Barras: (A) 1μm, (B) e (C) 0,5 μm, (D) 0,25 μm.

Após este primeiro reconhecimento, um sinal que incita o aumento do Ca^{+2} intracelular dispara a secreção dos micronemas. O mecanismo de controle da descarga dos micronemas ainda é desconhecido, mas se sabe que quinases dependentes de cálcio (CDPK) participam do processo. Uma CDPK de *Toxoplasma* (TgCDPK1), que já foi descrita como

capaz de regular a motilidade e a entrada do parasita, e a purfalcamina – um inibidor da CDPK de *Plasmodium* – que também inibe a entrada de *T. gondii* (revisto em Blader & Saeij, 2009).

As proteínas oriundas dos micronemas (MICs) são adesinas transmembrana, assim como algumas das proteínas, chamadas de adaptadoras, que auxiliam o endereçamento e exposição das MICs na superfície do parasita. A ligação das MICs com a célula hospedeira proporciona um contato íntimo das duas superfícies. Concomitante com estes eventos, outro sinal ainda não conhecido dispara a secreção do conteúdo de outra organela apical de *T. gondii*, a róptria (Figura 2B, Figura 3C-D). Proteínas das róptrias são liberadas e se ligam à proteína de superfície parasitária AMA1 (antígeno de membrana 1). Estas proteínas (RONs) provenientes do pescoço, região mais delgada da róptrias, vão se localizar na região de contato entre as duas células, onde ocorre a formação de uma junção análoga à do tipo ocludente, a 'junção móvel', descrita mais adiante.

Alguns estudos mostram que moléculas das róptrias são encontradas no interior da célula, mesmo antes da entrada efetiva de *T. gondii*. São elas ROP1, ROP2/3/4 e ROP18, além de uma das proteínas dos grânulos densos GRA7 (revisto em Blader & Saeij, 2009). Todas essas proteínas foram encontradas em pequenos agregados ou gotículas (ainda não foi comprovada a presença de membrana envolvendo o material) arranjadas em fileiras, no citoplasma da célula hospedeira. Acredita-se que elas poderiam estar associadas a microtúbulos, já que não são observadas quando as células são tratadas com nocodazol, droga que despolimeriza microtúbulos.

A capacidade de o parasita introduzir vesículas nas células a partir das róptrias foi demonstrada mesmo quando sua entrada foi bloqueada pela incubação a baixas temperaturas ou na presença de agentes despolimerizantes do citoesqueleto como a citocalasina, que despolimeriza microfilamentos. As vesículas observadas nestes experimentos foram denominadas de 'e-vacúolos' (do inglês *empty*) (Hakansson, Charron & Sibley, 2001). Porém, até o momento, não se sabe se estas vesículas têm ligação com os agregados em fileira.

Muitas destas proteínas (ROP2/3/4, GRA2 e GRA3) têm como destino a membrana do vacúolo parasitóforo e outras o interior do vacúolo parasitóforo, como a ROP1 (revisto em Ravindran & Boothroyd, 2008).

Outro grupo de proteínas das róptrias de *T. gondii*, também secretadas no interior da célula hospedeira, compõe-se de fosfatase 2C, chamada PP2C-hn (referente ao destino final no núcleo da célula hospedeira), e uma proteína quinase putativa, chamada ROP16, que também se localiza no núcleo das células infectadas. Estas duas moléculas possuem uma sequência de localização nuclear que garante seu direcionamento para o núcleo, e não são encontradas nas gotículas alinhadas referidas anteriormente, o que indica mais de um mecanismo de endereçamento de proteínas do parasita nos momentos iniciais da infecção por *T. gondii*.

A presença de uma quinase e de uma fosfatase no núcleo hospedeiro possibilitaria a interferência parasitária no controle da expressão gênica das células a serem infectadas. Já se observou que a ROP16 está envolvida com a ativação dos fatores de transcrição, STAT3 e STAT6, de maneira dependente da infecção. Estes fatores, por sua vez, estão envolvidos com a ativação da IL-12, citocina-chave na resposta do hospedeiro em face da infecção por *Toxoplasma*. Por outro lado, o papel da PP2C-hn ainda requer mais investigação.

Na região de contato entre o parasita e a membrana da célula hospedeira forma-se uma estrutura transitória, a 'junção móvel' (Mordue *et al.*, 1999). Neste ponto, o corpo celular apresenta uma constrição, assumindo uma forma de ampulheta (Figura 1D, F). As proteínas AMA1 (ancoradas por GPI e secretadas pelos micronemas) e as RON 2, 4, 5 e 8 (presentes no pescoço das róptrias e secretadas durante a invasão) já foram ali localizadas. Além disso, esta junção móvel parece atuar como um 'filtro', barrando proteínas transmembrana da membrana plasmática, que, independentemente do tamanho, são assim excluídas da membrana do vacúolo parasitóforo que está sendo formado (Figura 2B).

Ainda não é sabido se a membrana da célula hospedeira ou domínios de sua superfície se ancoram à estrutura transitória da junção móvel, tal como já foi identificado para a membrana do parasita. A actina do hospedeiro poderia desempenhar este papel por ter participação importante na dinâmica das membranas. Duas proteínas de róptrias, a toxofilina e a RON8, foram localizadas voltadas para o citoesqueleto da célula hospedeira e mostradas como sendo capazes de interagir com a actina do hospedeiro durante a infecção. Porém, o uso de citocalasina, que altera a polimerização da actina, na célula hospedeira não impede a entrada do parasita (revisto em Blader & Saeij, 2009).

A FORMAÇÃO DO VACÚOLO PARASITÓFORO

O movimento ativo característico dos membros do filo Apicomplexa (chamado deslizamento ou *gliding*), realizado pelo motor de actomiosina do parasita, faz que a formação do vacúolo parasitóforo ocorra simultaneamente com a invasão da célula (Figura 2B,C).

Em vários estudos, demonstrou-se que grande parte dos lipídios de membrana do vacúolo parasitóforo inicial provém da membrana plasmática da célula hospedeira. *Toxoplasma* parece definir ativamente a composição das proteínas deste vacúolo, selecionando, dentre as oriundas da membrana da célula hospedeira, apenas aquelas ligadas via GPI, excluindo nessa 'filtração' as com domínio transmembrana. Acredita-se que a junção móvel que se forma entre as membranas da célula e do parasita esteja envolvida com esta exclusão, e que o processo também possa ter associação com o mecanismo do qual *T. gondii* se utiliza para escapar da fusão com o sistema endolisossomal do hospedeiro.

As róptrias contribuem para a formação do vacúolo parasitóforo não apenas pela secreção de seu conteúdo, mas também pela incorporação de estruturas membranares à membrana vacuolar.

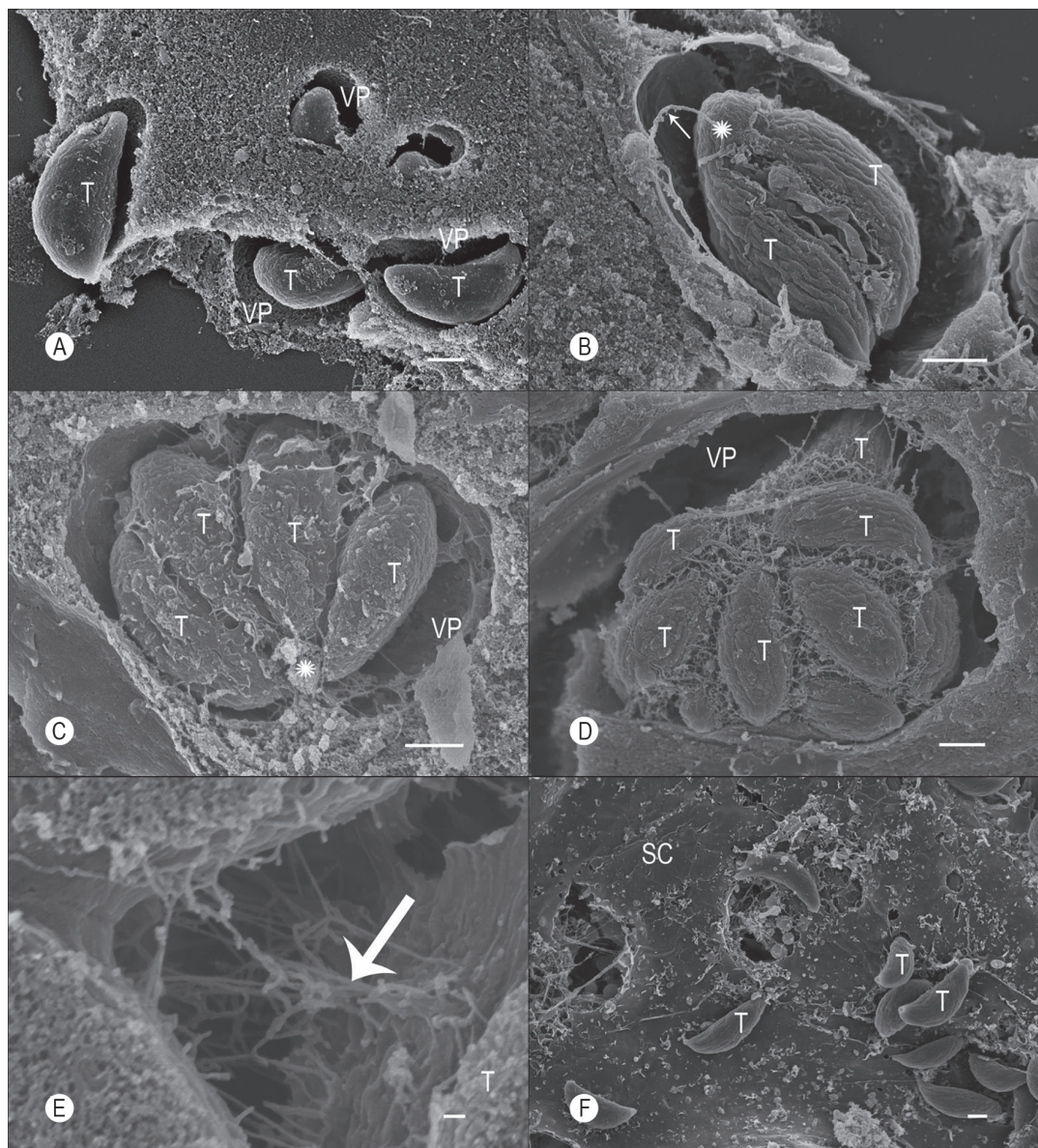
Outra molécula importante para a invasão e formação do vacúolo parasitóforo é o colesterol da célula hospedeira. Este é necessário para que o conteúdo das róptrias seja secretado e se forme o vacúolo. A membrana do vacúolo parasitóforo é formada majoritariamente por lipídios da membrana plasmática da célula hospedeira, e somente 20% são lipídios secretados pelo próprio parasita (Suss-Toby, Zimmerberg & Ward, 1996). Estes eventos iniciais estão resumidos na Figura 2.

A REDE INTRAVACUOLAR

Dentro do vacúolo parasitóforo (Figura 4A) estabelece-se um ambiente propício à sobrevivência e multiplicação do toxoplasma. Este inclui a rede intravacuolar, uma intrincada rede de túbulos limitados por unidade de membrana, resultado de secreção dos grânulos densos. O próprio crescimento e a manutenção do vacúolo parasitóforo também dependem da secreção do conteúdo desses grânulos densos. Suas proteínas (GRA) são secretadas no vacúolo intensamente logo após a invasão e constitutivamente durante a replicação intracelular do parasita (revisto em Cesbron-Delauw *et al.*, 2008). As GRAs são incorporadas à membrana do vacúolo e a uma rede formada dentro do vacúolo, a rede intravacuolar, constituída de nanotúbulos de cerca de 30 nm de diâmetro (Figura 4 D-E). Estes túbulos podem se ramificar e se fundir, mantendo seu diâmetro uniforme (Figura 4E). Enquanto GRA3, GRA5, GRA7 e GRA 8 são incorporadas à membrana do vacúolo parasitóforo, GRA2, GRA4 e GRA6 formam um complexo que interage e estabiliza as membranas da rede intravacuolar (Labruyere *et al*., 1999).

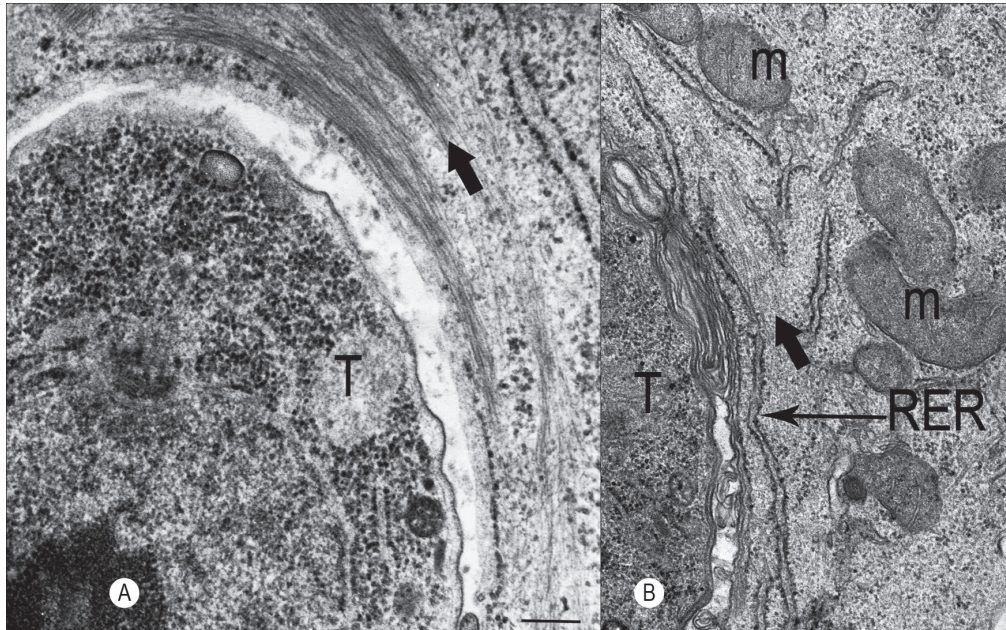
Já foi observada a fusão entre os túbulos e a membrana do vacúolo parasitóforo, mas não entre o túbulo e a membrana do parasita. Com relação à função desta rede, foi aventado que poderia servir para captação de nutrientes do citosol para o vacúolo. Entretanto, uma vez que a membrana do vacúolo é permeável a moléculas de até 1.300 Da,

uma função mais razoável para esta rede, conforme observado por Magno e colaboradores (2005), é a de sustentação da roseta de parasitas à medida que se sucedem os ciclos endodiogênicos (Figura 4 B-D).

Figura 4 – Sequência de imagens em microscopia eletrônica de varredura da interação e desenvolvimento de *Toxoplasma gondii* em células de mamíferos: desenvolvimento intracelular e egresso

(A) Uma única célula invadida por vários taquizoítas (T). Cada vacúolo parasitóforo (VP) inicial contém um taquizoíta. (B) Seis a oito horas após a invasão, o primeiro ciclo de endodiogenia já está completo. As duas células-filhas (T) permanecem ligadas a um corpo residual (*). Elementos da rede intravacuolar já estão presentes (seta). (C) Uma segunda divisão dá origem a quatro taquizoítas (T) e assim sucessivamente. (D) Vinte e quatro a 48 horas pós-infecção, cada vacúolo parasitóforo possui um grande número de parasitas (T) ligados a um único corpo residual, o que lhe confere a aparência de uma roseta. (E) Em maior aumento é possível observar os túbulos que compõem a rede intravacuolar (seta) conectando o parasita (T) à face interna do vacúolo parasitóforo. (F) No momento do egresso, as rosetas se desfazem. Os parasitas individualizados (T) abandonam o vacúolo parasitóforo e a célula hospedeira, terminando por rompê-la. SC = superfície da célula hospedeira. Barras: (A), (B), (C), (D), (F), 1 μm. (E) 100 μm.

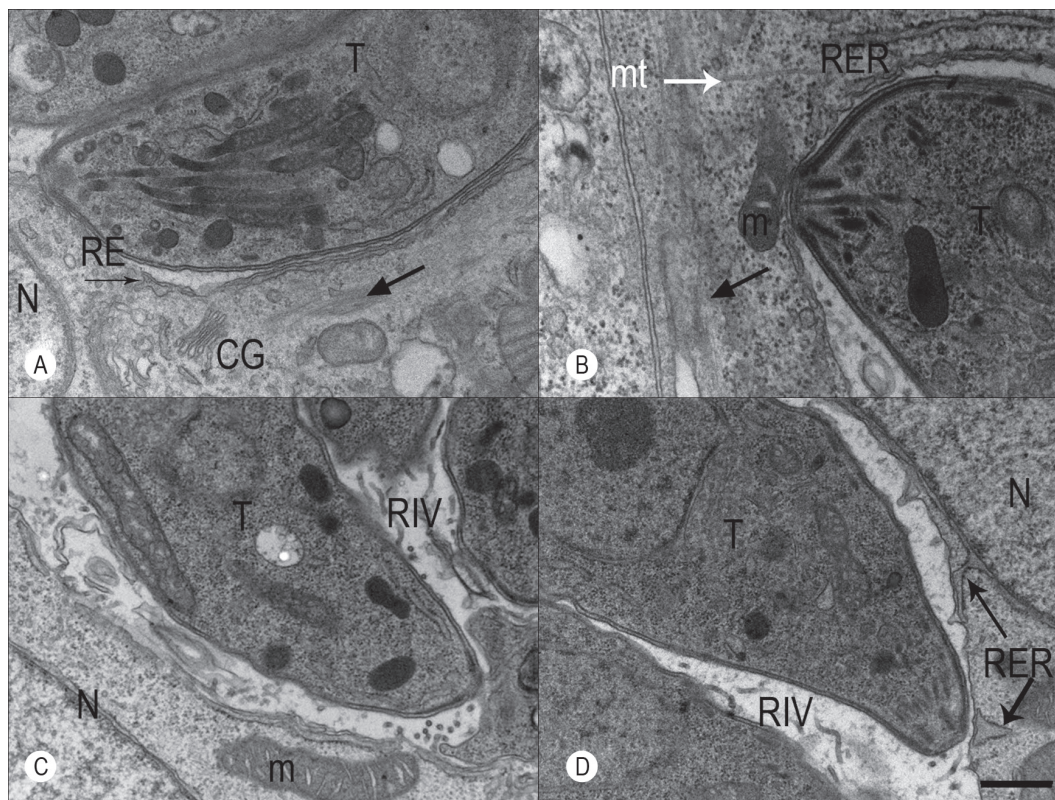
INTERFERÊNCIA DE *T. GONDII* NA CÉLULA HOSPEDEIRA

A infecção da célula hospedeira por *T. gondii* leva a várias modificações na sua organização estrutural e funcional. Entre as mais significativas, podemos mencionar o rearranjo do citoesqueleto da célula hospedeira e a redistribuição do retículo endoplasmático e das mitocôndrias (Figuras 2 e 5).

Figura 5 – Aspectos da associação de organelas da célula hospedeira ao redor do vacúolo parasitóforo observados por microscopia eletrônica de transmissão

(A) Feixes de filamentos intermediários se dispõem em torno do vacúolo parasitóforo (seta espessa). (B) Detalhe mostrando a estreita associação entre o retículo endoplasmático rugoso da célula hospedeira (RER) e o vacúolo parasitóforo, no interior do qual vemos um taquizoíta (T). Feixes de filamentos (seta espessa) como os observados em (A) e mitocôndrias (m) também se dispõem ao redor do vacúolo. Barra: 0,25 μm.

À medida que cresce, o vacúolo parasitóforo atinge volumes expressivos e forma-se a seu redor um arcabouço de filamentos intermediários que certamente contribuem para sua estabilidade (Figuras 5A, 6A). Os microtúbulos da célula hospedeira também formam arranjos em paralelo que parecem contribuir para a sustentação do vacúolo parasitóforo (Figura 6B). O retículo endoplasmático rugoso envolve o vacúolo parasitóforo de modo que os ribossomos se localizem apenas na face deste voltada para o citosol (Figuras 2 e 5B).

A associação de mitocôndrias à membrana do vacúolo parasitóforo está relacionada com ROP2, uma proteína transmembrana que expõe sua porção N-terminal no citoplasma da célula hospedeira (Figura 6B). Esta porção N-terminal apresenta uma sequência de aminoácidos que se assemelha ao sinal de importação mitocondrial. Assim, esta sequência da ROP2 é inserida na membrana mitocondrial externa (demonstrado com mitocôndrias *ex vivo*), promovendo a associação membrana do vacúolo parasitóforo-mitocôndria. Esta associação com a mitocôndria, além da ligação com o retículo endoplasmático (por um mecanismo ainda não definido) facilitaria a aquisição de lipídios pelo parasita (Sinai & Joiner, 2001).

Figura 6 – Outros aspectos da associação de organelas da célula hospedeira ao redor do vacúolo parasitóforo observados por microscopia eletrônica de transmissão

A associação a elementos do retículo endoplasmático (RE) rugoso é vista em todas as micrografias e a proximidade ao núcleo da célula hospedeira é vista em (A), (C) e (D). Em (A) observam-se cisternas do complexo de Golgi (CG) e feixes de filamentos intermediários em torno do vacúolo (seta espessa). Em (B) além de filamentos, também é claramente visível um microtúbulo (seta branca) e uma mitocôndria (m) ao redor do vacúolo. Em (C) e (D) observa-se a presença de túbulos da rede intravacuolar (RIV). T = taquizoítas. Barra: 1 μm.

Outra alteração importante é o completo bloqueio da interação (fusão) entre componentes do sistema endolisossomal e o vacúolo parasitóforo, impedindo assim o contato dos parasitas intravacuolares com enzimas hidrolíticas. Em contrapartida, a importação de lisossomos para dentro do vacúolo parasitóforo já foi observada e será explicada mais adiante. Nutrientes, e mais especificamente o colesterol, utilizados pelo parasita seriam importados por esta via. A inativação das hidrolases lisossomais seria feita por proteinases presentes no vacúolo, e a acidificação da sua matriz seria evitada pela presença de poros na membrana do mesmo.

O centro organizador de microtúbulos, o citoesqueleto propriamente dito e estruturas a ele relacionadas, como o complexo de Golgi, são reposicionados na célula infectada (Figura 6A). Ao menos em astrócitos, o vacúolo parasitóforo, além de estar sempre próximo a essas duas estruturas (centrossomo e complexo de Golgi), também é circundado por filamentos intermediários (Figura 5A, B). O reposicionamento faz que o vacúolo parasitóforo fique perto do núcleo, facilitando a interceptação de purinas pelo parasita, já que ele não é capaz de realizar a síntese *de novo* destas moléculas (Figura 6 A-D).

A presença do parasita, ou mesmo de fatores por eles liberados, interfere inclusive no ciclo celular da célula hospedeira. As células tendem a entrar na fase S do ciclo, situação que facilita a infecção pelo parasita (Grimwood, Mineo & Kasper, 1996).

CAPTAÇÃO DE NUTRIENTES

Após a entrada e formação do vacúolo, o parasita precisa captar nutrientes por mecanismos que o mantenham afastado da acidificação e fusão lisossomal e permitam o crescimento e multiplicação intracelular.

Moléculas de até 1.300 Da têm livre passagem entre o citoplasma da célula hospedeira e a matriz do vacúolo parasitóforo, o que sugere que proteínas presentes na membrana do vacúolo parasitóforo estariam associadas umas às outras, formando poros e permitindo este tráfego de solutos de baixo peso molecular que o parasita poderia usar no seu metabolismo (Schwab, Beckers & Joiner, 1994).

São vários os nutrientes que *T. gondii* não é capaz de sintetizar *de novo*, precisando contar com os nutrientes do ambiente intracelular. A lista inclui pequenas moléculas como glicose, arginina, ferro, triptofano e purinas, que podem se difundir livremente através da membrana do vacúolo parasitóforo ou ser transportadas para dentro do vacúolo parasitóforo por transportadores de membrana. Um transportador de glicose já foi identificado, porém ainda não é bem sabido como o parasita usa essa fonte de energia. No genoma de *T. gondii* já foram identificadas todas as enzimas glicolíticas do ciclo de Krebs, embora o crescimento parasitário seja afetado apenas moderadamente na ausência dessa via metabólica funcional. É sabido que o toxoplasma pode gerar a maior parte do seu ATP por meio de fosforilação oxidativa no substrato. Porém, a piruvato desidrogenase (enzima que converte piruvato em acetil-CoA), está localizada no apicoplasto (organela de origem endossimbiótica, possuidora de genoma próprio) e não na mitocôndria, como em outras células eucarióticas. Outras moléculas são adquiridas por outros mecanismos direcionados pelo parasita, como a LDL. A infecção por *T. gondii* aumenta a expressão de receptores para LDL em células infectadas e causa o redirecionamento do tráfego intracelular de LDL da célula hospedeira para o vacúolo parasitóforo. Já foi mostrado que lisossomos da célula hospedeira seriam sequestrados para a matriz vacuolar, otimizando a captação de metabólitos celulares pelo parasita. *T. gondii* recrutaria microtúbulos da célula hospedeira, que formariam longos túbulos de membrana recobertos por GRA7. Já foi demonstrado *in vitro* que um recombinante dessa proteína de grânulo denso é capaz de estimular a formação de túbulos em lipossomos, papel semelhante ao desempenhado por dinaminas no pinçamento de vesículas a partir de membranas. Por esse mecanismo, haveria a internalização do conteúdo dos lisossomos e eventualmente colesterol em partículas de LDL. Uma vez na matriz do vacúolo parasitóforo, ainda não se sabe como o parasita seria capaz de captá-las (Coppens *et al.*, 2006).

O EGRESSO DA CÉLULA HOSPEDEIRA

A cada ciclo replicativo por endodiogenia, cada taquizoíta intracelular dá origem a duas células-filhas que permanecem ligadas ao corpo residual pela extremidade posterior (Figura 4B, C). O resultado desses ciclos é a formação de uma roseta de parasitas que ocupa um vacúolo cujo volume chega a ser oito vezes maior que o vacúolo parasitóforo inicial (Figura 4D). Como cada célula hospedeira pode ser invadida por mais de um parasita (Figura 4A), o tamanho de cada vacúolo parasitóforo e o número de parasitas nele contido dependerá do tamanho da célula e do número de vacúolos parasitóforos que nela se formam. Dependendo desses fatores, entre 24 e 48 horas após a invasão inicial de uma célula, ocorre a última etapa do ciclo intracelular: o egresso (Caldas, Souza & Attias, 2010).

Ao contrário do que se possa crer, o egresso não resulta do rompimento de uma célula hiperparasitada. Diferente de outros patógenos (por exemplo, *Trypanosoma cruzi* e algumas bactérias), que escapam do vacúolo logo após penetrar na célula hospedeira, *T. gondii* reside no vacúolo parasitóforo durante todo o ciclo intracelular. Assim sendo, o egresso requer que duas barreiras sejam atravessadas: a membrana do vacúolo parasitóforo e a membrana plasmática da célula hospedeira (Figura 4F).

O que determina o egresso? Alguns autores sustentam que o crescimento dos vacúolos parasitóforos exerce pressão sobre a membrana plasmática, resultando em microlesões da membrana plasmática e perda do equilíbrio iônico citoplasmático. A perda de potássio intracelular dispararia, via fosfolipase C (PLC), levando a um aumento dos níveis intraparasitários de cálcio. O cálcio seria, assim, o gatilho para o egresso. O cátion participa de vários processos-chave na interação parasita-célula hospedeira. O uso do ionóforo A23817 foi capaz de induzir o egresso de taquizoítas apenas duas horas após a invasão, antes mesmo da primeira divisão por endodiogenia, indicando que o rompimento da membrana plasmática da célula hospedeira seria consequência de um processo iniciado intracelularmente. A observação do egresso induzido por ionóforo em células de cultura infectadas por *T. gondii* após 24 horas por videomicroscopia e microscopia eletrônica indica que o processo envolve vários fenômenos, uma vez disparado. Em um primeiro momento, a rede intravacuolar de nanotúbulos se fragmenta. A ligação entre as células-filhas de cada roseta se torna, assim, mais frágil, facilitando a separação entre os taquizoítas e o corpo residual. Uma vez individualizados, os parasitas, que se mantinham praticamente imóveis dentro do vacúolo parasitóforo, começam a se movimentar randomicamente. O conoide, que durante este período de replicação permanece posicionado abaixo do anel polar posterior, também readquire movimento, elevando-se acima deste, tal como é observado durante a invasão. Nessa etapa, proteínas semelhantes a porinas são secretadas pelos micronemas, inserindo-se na membrana do vacúolo parasitóforo e abrindo nela orifícios que a permeabilizam e fragilizam, facilitando assim o egresso dos taquizoítas (Caldas, Souza & Attias, 2010).

Uma vez rompida a barreira do vacúolo parasitóforo, os taquizoítas deslocam-se pelo citosol, provavelmente utilizando o citoesqueleto da célula hospedeira. Eventualmente, encontram a membrana plasmática, que também é permeabilizada pela inserção de porinas. Devido ao caráter randômico desse deslocamento, alguns parasitas terminam por penetrar no núcleo da célula-hospedeira. Entretanto, esta parece ser uma condição acidental que não viabiliza a sobrevida e a multiplicação desse indivíduo.

Na medida em que migram pelo citosol e atravessam a membrana plasmática, os taquizoítas se desassociam de remanescentes da membrana do vacúolo parasitóforo que tenham permanecido aderidos à sua superfície, estabelecendo, nesse momento, um contato direto com o citosol da célula hospedeira. Ao atingir o meio extracelular, os taquizoítas já se encontram individualizados e aptos a invadir novas células.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há, como se vê, uma série de questões em aberto no que se refere à interação de *Toxoplasma gondii* e suas células hospedeiras. Persiste grande dificuldade em identificar processos e moléculas essenciais para o reconhecimento e invasão dos tipos celulares suscetíveis à infecção por *T. gondii*. Além disso, a reação individual de cada hospedeiro ao curso da infecção, variações de virulência entre as cepas utilizadas nos experimentos e uma série de outras variáveis requerem mais pesquisas antes que postulados definitivos possam ser enunciados. O que há de inegável é a grande gama de estratégias que levam o protozoário a sobreviver e se disseminar entre os hospedeiros com sucesso raramente observado nas relações parasitárias.

REFERÊNCIAS

BLADER, I. J. & SAEIJ, J. P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *Apmis*, 117: 458-476, 2009.

CALDAS, L. A.; SOUZA, W. & ATTIAS, M. Microscopic analysis of calcium ionophore activated egress of *Toxoplasma gondii* from the host cell. *Veterinary Parasitology*. 167: 8-18, 2010.

CARRUTHERS, V. B. & BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Current Opinion in Microbiology*, 10: 83-89, 2007.

CARRUTHERS, V. B. *et al*. *Toxoplasma gondii* uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment. *Infection and Immunity*, 68: 4.005-4.011, 2000.

CESBRON-DELAUW, M. F. *et al*. Apicomplexa in mammalian cells: trafficking to the parasitophorous vacuole. *Traffic*, 9: 657-664, 2008.

CHARRON, A. J. & SIBLEY, L. D. Molecular partitioning during host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. *Traffic*, 5: 855-867, 2004.

COPPENS, I. *et al*. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. *Cell*, 125: 261-274, 2006.

DAHER, W. & SOLDATI-FAVRE, D. Mechanisms controlling glideosome function in apicomplexans. *Current Opinion in Microbiology*, 12: 408-414, 2009.

DUBREMETZ, J. F. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. *Cellular Microbiology, 9: 841-848, 2007.*

GRIMWOOD, J.; MINEO, J. R. & KASPER, L. H. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells is host cell cycle dependent. *Infection and Immunity*, 64: 4.099-4.104, 1996.

HÅKANSSON, S.; CHARRON, A. J. & SIBLEY, L. D. *Toxoplasma* evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *The Embo Journal*, 20: 3.132-3.144, 2001.

LABRUYERE, E. *et al*. Differential membrane targeting of the secretory proteins GRA4 and GRA6 within the parasitophorous vacuole formed by *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 20: 311-324, 1999.

LAMBERT, H. *et al*. Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. *Cellular Microbiology*, 8: 1.611-1.623, 2006.

MACLAREN, A.; ATTIAS, M. & SOUZA, W. Aspects of the early moments of interaction between tachyzoites of *Toxoplasma gondii* with neutrophils. *Veterinary Parasitology*, 10: 301-312, 2004.

MAGNO, R. C. *et al*. Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole. *Microscopy Research and Technique*, 67: 45-52, 2005.

MORDUE, D. G. *et al*. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *The Journal of Experimental Medicine*, 190: 1.783-1.792, 1999.

ORTEGA-BARRIA, E. & BOOTHROYD, J. C. A *Toxoplasma* lectin-like activity specific for sulfated polysaccharides is involved in host cell infection. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 1.267-1.276, 1999.

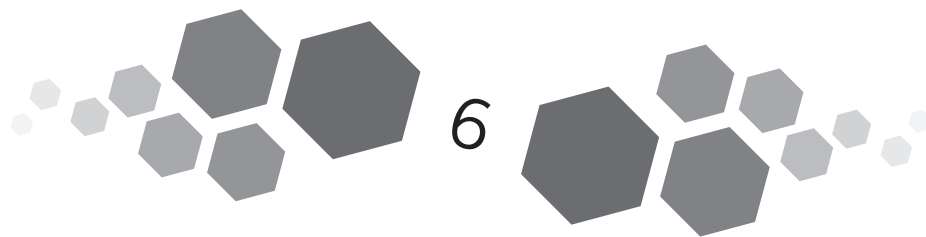
RAVINDRAN, S. & BOOTHROYD, J. C. Secretion of proteins into host cells by Apicomplexan parasites. *Traffic*, 9: 647-656, 2008.

ROBBEN, P. M. *et al*. Recruitment of Gr1+ monocytes is essencial for control of acute toxoplasmosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 201: 1.761-1.769, 2005.

SINAI, A. P. & JOINER, K. A. The *Toxoplasma gondii* protein ROP2 mediates host organelle association with the parasitophorous vacuole membrane. *The Journal of Cell Biology*, 9: 95-108, 2001.

SCHWAB, J. C.; BECKERS, C. J. M. & JOINER, K. A. The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 509-513, 1994.

SUSS-TOBY, E.; ZIMMERBERG, J. & WARD, G. E. *Toxoplasma* invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 8.413-8.418, 1996.

TONKIN, M. L. *et al*. Host cell invasion by apicomplexan parasites: insights from the co-structure of AMA1 with a RON2 peptide. *Science*, 333: 463, 2011.

Resposta Imune na Infecção por *Toxoplasma gondii*: desafios e oportunidades

Joseli Lannes-Vieira

INTERAÇÃO DE *TOXOPLASMA GONDII* COM O SISTEMA IMUNE

Toxoplasma gondii infecta o homem de três diferentes modos: pela ingestão de oocistos, pela ingestão de cistos teciduais e por infecção congênita por taquizoítas. A doença ocorre muito frequentemente na população humana sob a forma de infecção crônica assintomática. Como em outras relações parasita-hospedeiro, o resultado final da infecção por *T. gondii* depende da virulência da cepa do parasita e das características genéticas, do *status* imune e da imunocompetência temporal do hospedeiro.

Ao penetrarem em seus hospedeiros, as formas taquizoítas de *T. gondii* proliferam em vários órgãos, induzindo resposta imune, caracterizada por ativação celular e produção de mediadores microbicidas, citocinas e anticorpos. Contudo, o parasita sobrevive à ação destes mecanismos efetores, mantendo a infecção crônica e, aparentemente, silenciosa. Nos últimos anos, foram revelados alguns mecanismos desenvolvidos por *T. gondii* que resultam em evasão da resposte imune, tais como: mecanismos diretos de interferência nos processos de sinalização celular e de estabelecimento de nicho intracelular; e mecanismos indiretos que resultam na alteração de expressão e secreção de citocinas e da viabilidade das células imunes. Nesses estudos também se observou que a coexistência parasita-hospedeiro depende de processos ativos do parasita e de populações celulares do hospedeiro, como enterócitos, neutrófilos, células dendríticas (DCs), macrófagos, células *natural killer* (NK) e células T. Esses grupos celulares levam à modulação de processos imunes envolvendo: receptores do tipo Toll (TLRs); ativação de vias de sinalização; produção de citocinas; e mecanismos microbicidas, como a geração de intermediários reativos de nitrogênio (RNIs) e intermediários reativos de oxigênio (ROIs). Dessa forma, ainda que a resposta imune não seja completamente abolida, a resposta efetora é diminuída e a infecção crônica se estabelece, com o parasita na forma de cistos de bradizoítas, principalmente no tecido muscular e no sistema nervoso central (SNC).

PASSOS INICIAIS NO ENTENDIMENTO DA RESPOSTA IMUNE NA INFECÇÃO POR *TOXOPLASMA GONDII*

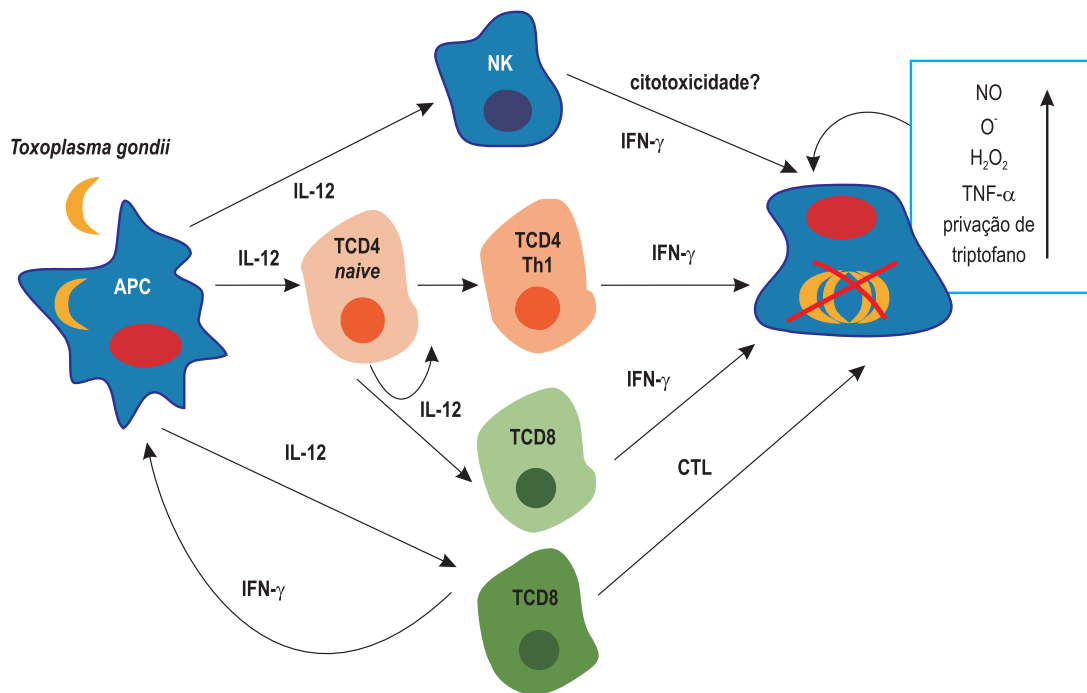
Na década de 1940, Sabin e Feldman descreveram em pacientes com toxoplasmose a presença de anticorpos anti-*T. gondii* com a capacidade de ativar complemento e induzir a lise do parasita, sugerindo ser este um mecanismo efetor importante no controle da infecção. No período de 1960 a 2000, a identificação de citocinas, dos subtipos de células T, do mecanismo molecular de reconhecimento de antígenos e da participação de citocinas no processo de diferenciação e ativação de células imunes resultou em grandes avanços no entendimento da resposta imune celular adaptativa na infecção por *T. gondii*.

A infecção de hospedeiros imunocompetentes leva à potente resposta imune celular resultando no controle do parasita, que pode ocorrer mediante a lise de células infectadas, principalmente por ação de linfócitos T $CD8^+$ citotóxicos e, possivelmente, por células NK, ou pela ativação das células infectadas por citocinas, impedindo a multiplicação do parasita. Em experimentos de depleção de células efetoras com anticorpos, de infecção de animais geneticamente deficientes em uma determinada população celular ou de transferência de células, observou-se a participação crucial e sinergística das células T $CD4^+$ e $CD8^+$ no controle da infecção aguda e na geração da imunidade protetora na infecção por *T. gondii*. Além disso, em estudos de bloqueio da ação de citocinas com uso de anticorpos ou com animais geneticamente deficientes, verificou-se que as citocinas pró-inflamatórias interleucina (IL)-12, interferon (IFN)-γ e fator de necrose tumoral (TNF)-α são protagonistas na resistência ao parasita. Durante a fase aguda da infecção, ocorre uma cascata de eventos imunológicos, que poderiam ser assim resumidos: IL-12, produzida por neutrófilos, macrófagos e DCs, estimula as células NK a produzir IFN-γ. Este, com TNF-α, ativa macrófagos e outras populações celulares que eliminam os parasitas mediante a combinação de uma série de mecanismos dependentes de ROIs e RNIs. A morte do parasita com liberação de seus antígenos leva à ativação dos processos de apresentação antigênica, resultando na ativação das células T $CD4^+$ e $CD8^+$, com geração de imunidade protetora e memória imunológica.

O IFN-γ desempenha papel central na resposta imune em hospedeiros imunocompetentes que controlam a infecção por *T. gondii* e desenvolvem imunidade protetora de longa duração. Em camundongos, a depleção de IFN-γ resulta em suscetibilidade à infecção aguda com a cepa avirulenta ME-49. A persistência silenciosa do parasita também é dependente de IFN-γ, pois a sua depleção na fase crônica leva à reativação da infecção, com aumento do número de cistos de bradizoítas e de taquizoítas livres, assim como de focos inflamatórios no SNC. Em estudos em camundongos com imunodeficiência combinada grave (IDCG – ou SCID, sigla em inglês para *severe combined immunodeficiency*), deficientes em células T e B, observou-se que as células NK são a principal fonte de IFN-γ na infecção aguda por *T. gondii*, participando IL-12 e TNF-α de forma sinergística na sua indução. Por outro lado, TNF-α participa diretamente da resistência à infecção aguda por *T. gondii*, que parece depender também de macrófagos ativados, mediante a produção de ROIs, especialmente da síntese de óxido nítrico (NO) dependente da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS).

Nas décadas de 1970 e 1980, o aumento da frequência de pacientes imunocomprometidos, tratados com as drogas imunossupressoras recém-descobertas (nos casos de transplante, câncer ou autoimunidade) ou portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids) com depleção seletiva de células T $CD4^+$, levou ao aumento da reativação da toxoplasmose com desenvolvimento de quadros graves de encefalite toxoplásmica (TE). Por serem as células T o principal componente do sistema imunocomprometido nessas situações terapêuticas ou de coinfecção, essas células tornaram-se o foco central das pesquisas sobre a resposta imune na infecção por *T. gondii*. Em estudos de depleção das populações celulares, observa-se que ambas as subpopulações de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ são importantes na resistência a *T. gondii* tanto na fase aguda quanto na crônica. A depleção conjunta de células T $CD4^+$ e $CD8^+$, mas não das populações isoladas, durante a infecção crônica de animais C57BL/6 pela cepa ME-49, resultou em

aumento da mortalidade associada ao aumento do número de cistos no SNC e na formação de TE, sugerindo a participação sinergística de células T CD4$^+$ e CD8$^+$ na prevenção da reativação da TE. Quanto à contribuição diferencial das subpopulações de células T na imunidade anti-*T. gondii*, de modo geral, os linfócitos T CD8$^+$ constituem as células efetoras, enquanto os linfócitos T CD4$^+$ induzem ou regulam, pela secreção de IFN-γ e IL-2, a atividade dos linfócitos T CD8$^+$. Observou-se, em estudos em camundongos CD4$^{-/-}$, que a resposta de células T CD8$^+$ citotóxicas específicas para antígenos de *T. gondii* na fase aguda é independente das células T CD4$^+$; contudo, estas são essenciais para a resposta efetora e a geração de memória de célula T CD8$^+$ na fase crônica da infecção. Os processos de ativação da resposta celular que levam ao controle do parasita estão resumidos na Figura 1.

Figura 1 – Ativação da imunidade celular efetora na infecção por *Toxoplasma gondii*

As células apresentadoras de antígenos (APCs), como células dendríticas (DCs) e macrófagos, reconhecem o parasita e se tornam ativadas. Interleucina (IL)-12 produzida pelas APCs ou neutrófilos induz as células *natural killer* (NK) a produzir interferon (IFN)-γ. As APCs também ativam células T CD4$^+$ *naive*, ao apresentar antígenos e secretar IL-12, que se diferenciam em Th1. Estas produzem IL-2, que atua de forma autócrina a parácrina ativando as células T CD8$^+$. As células T CD4$^+$ e CD8$^+$ ativadas produzem IFN- γ, IFN- γ ativa STAT1, que leva à ativação de vários mecanismos microbicidas (intermediários reativos de oxigênio – ROIs –, privação de triptofano etc.) que limitam a replicação de T. gondii. As T CD8$^+$ (CTL) e, possivelmente, as células NK podem também contribuir para o controle da infecção, induzindo a lise das células infectadas.

O papel das diferentes subpopulações de células T CD4$^+$ (como Th1, Th2, Th17 e T reguladoras) e CD8$^+$ (inflamatórias-produtoras de IFN-γ e citotóxicas) durante a infecção pelo *T. gondii* ainda não foi totalmente esclarecido. Na infecção experimental, as células CD4$^+$ do baço e linfonodos mostram um padrão de expressão de citocinas do tipo Th1 altamente polarizado, marcado pela produção de IL-2 e IFN-γ. De fato, IL-12 produzida pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), assim como a produção inicial de IFN-γ por células NK, é essencial para a diferenciação de células CD4$^+$ *naive* para linfócitos do tipo Th1, durante a infecção por *T. gondii*. Contudo, a resposta imune parece ser compartimentalizada, uma vez que, entre as células inflamatórias isoladas do SNC durante a TE, as células T CD4$^+$ exibem fenótipos Th1 e Th2, enquanto as células T CD8$^+$ exibem um fenótipo Tc1. Contudo, os mecanismos que resultam na compartimentalização

diferenciada de populações celulares em tecidos-alvo da infecção, assim como a consequente evolução da infecção no hospedeiro, não estão esclarecidos.

Ainda que a resposta imune celular seja crítica no controle da infecção por *T. gondii*, anticorpos podem potencializar ou bloquear mecanismos imunoprotetores, ou mesmo mediar o dano tecidual, direta ou indiretamente, ativando complemento ou resposta de citotoxicidade dependente de anticorpos. *T. gondii,* independentemente do hospedeiro, induz altos níveis de imunoglobulinas totais (IgM, IgG, IgA e IgE) e de IgM e IgA específicos no soro de sete a dez dias após a infecção. Em modelos experimentais, os níveis de IgA estão relacionados à presença de IL-10 e fator transformante de crescimento (TGF)-β. IgE, ausente no modelo murino durante a infecção por *T. gondii*, em outros hospedeiros é restrita à fase aguda, sendo induzida por IL-4. No modelo murino, à produção de IgM e IgA segue-se a produção de anticorpos das subclasses IgG2a e IgG2b, induzidas por IFN-γ; e IgG1, induzida por IL-4 e IL-13. No homem, a relação entre subclasses de IgG e citocinas indutoras é mais complexa. IgG1 e IgG3 são induzidas por IFN-γ e aumentadas por IL-10 e TGF-β. IgG2 tem seu *switch* induzido por IL-2, sendo aumentada por IL-6, enquanto IgG4 é induzida por IL-4 e IL-13. Com relação à cinética de produção de imunoglobulinas durante a infecção por *T. gondii*, IgG1 é a mais precoce, mas não há consenso quanto à cinética das outras subclasses de IgG. Deve-se considerar que durante a infecção por *T. gondii* em humanos as classes e subclasses de imunoglobulinas apresentam padrão diferente do encontrado no modelo murino. Uma vez que citocinas regulam o *switch* de classe-subclasse de imunoglobulinas, anticorpos podem ser biomarcadores de eventos imunocelulares protetores ou patológicos que estejam ocorrendo em compartimentos do hospedeiro humano. Tais eventos, por causa das limitações de acessibilidade, são difíceis de ser explorados.

Na infecção humana por *T. gondii*, a presença de classes e subclasses de anticorpos, assim como seus títulos, são relevantes para o diagnóstico de fase aguda ou crônica, assim como para indicação de reativação ou mesmo de reinfecção. A persistência de IgM na fase crônica tem sido descrita em situação de reativação, no caso da toxoplasmose congênita, em situações pós-tratamento específico, assim como associada à reativação de cistos. Contudo, o significado biológico da persistência de IgM na fase crônica precisa ser esclarecido. Por outro lado, a presença de IgE durante a fase crônica pode indicar reativação, em virtude da polarização para a resposta imune para um perfil Th2.

A identificação de antígenos reconhecidos pelos anticorpos na infecção por *T. gondii* em animais e humanos revela-se interessante, seja para diagnóstico, identificação de fase de infecção ou produção de vacinas. Quanto aos antígenos reconhecidos pelos anticorpos, SAG1/p30, restrito a taquizoítas, e SAG2/p22, ambos antígenos de superfície, são imunodominantes. Contudo, em pacientes a resposta humoral é muito heterogênea quanto ao padrão de antígenos reconhecidos e às classes e subclasses de imunoglobulinas que os reconhecem, não havendo até o momento um padrão de reconhecimento antigênico que identifique as fases da infecção. Isso é um desafio para o desenvolvimento de ensaios de diagnóstico.

Outro aspecto interessante refere-se à compartimentalização de classes de imunoglobulinas em determinados sítios e o significado de seu encontro em alguns fluidos. A síntese local de anticorpos pode ser detectada na mucosa intestinal e em outros compartimentos, contudo anticorpos de algumas classes podem atravessar fronteiras biológicas como as barreiras hematoencefálica, hemato-ocular e placentária. De modo interessante, em porcos infectados por *T. gondii* demonstrou-se que enquanto na periferia as DCs produzem IL-12 e estimulam a produção de IFN-γ ligado à produção de IgG, no trato intestinal as DCs produzem IL-10 e estimulam a secreção de IgA. Esta IgA produzida localmente atinge a circulação, sendo detectada antes da IgG. Já em pacientes com uveíte, IgA secretora específica para antígenos do *T. gondii* foi encontrada na lágrima, não sendo detectada no soro, o que sugere a produção local desta imunoglobulina. IgA secretora específica para antígenos do parasita é encontrada no leite e nas secreções intestinais de camundongos infectados, sendo possivelmente produzida no local de secreção destes fluidos. Ainda

que IgM, IgA e IgG sejam encontradas no fluido cerebroespinhal na TE associada à Aids, a existência de síntese local dessas imunoglobinas não está esclarecida. Por outro lado, a síntese intraocular de IgA e IgG foi demonstrada, ainda que estas classes de imunoglobulinas também atravessem a barreira hemato-ocular. Quanto à barreira placentária, de muito é conhecido que IgM, IgA e IgE não atravessam essa barreira, enquanto todas as subclasses de IgG a atravessam de forma dependente de receptores da porção Fc de imunoglobulinas (FcR)n.

Animais deficientes em células B, assim como os deficientes em células T, são mais suscetíveis à infecção por *T. gondii* e respondem de forma insatisfatória à vacinação. Por sua vez, animais deficientes em células T CD4^{+} infectados pela cepa altamente virulenta RH podem ter sua vida prolongada pela transferência de soro de animais imunizados. Anticorpos específicos para o parasita exercem papel importante na lise de taquizoítas por ativação da via clássica do complemento, sendo os parasitas resistentes ao complemento. Além disso, anticorpos podem bloquear a entrada dos parasitas nas células hospedeiras. Anticorpos anti-SAG1/p30 são eficientes no bloqueio da infecção sistêmica e em mucosa. Em alguns casos, o FcR pode ter efeito facilitador de transporte e mesmo efeito concentrador, que podem estar relacionados à resistência e à patologia da infecção toxoplásmica.

A interação da resposta imune celular e humoral fica evidenciada quando IFN-γ potencializa a resposta citotóxica que resulta na lise de taquizoítas dependente de anticorpos pelas células NK de forma dependente do Fc-γ-RIII. Também, IFN-γ aumenta a fagocitose de parasitas por macrófagos de forma dependente de FcR, levando à destruição intracelular de taquizoítas. Além disso, células B participam da ativação de células T, potencializando a resposta destas últimas na infecção por *T. gondii*. Por outro lado, a presença de isótipos de imunoglobulinas que fixam complemento e estão ligados à resposta Th1 tem sido associada à inflamação não benéfica com presença de TNF-α e NO.

Ainda que muito se conheça sobre a resposta adaptativa desenvolvida por células T e B no controle do parasita e na geração da memória imune na infecção por *T. gondii*, esses conhecimentos ainda não são suficientes para o desenvolvimento de estratégias vacinais e imunoterapêuticas eficientes, e certamente muito resta a ser desvendado.

O RECONHECIMENTO INICIAL DE *TOXOPLASMA GONDII* PELO SISTEMA IMUNE

A resposta imune inata representa a primeira linha de interação entre um organismo invasor e o hospedeiro. Com a descoberta de moléculas que reconhecem padrões moleculares conservados em patógenos (PAMPs), como os receptores de manose CD14 e, sobretudo, os TLRs, os mecanismos iniciais da interação parasita-hospedeiro, com participação de componentes celulares do sistema imune inato e sua contribuição para o controle do parasita e para o estabelecimento da fase crônica da infecção, tornaram-se foco principal dos estudos nos últimos dez anos da pesquisa da interação sistema imune-*T. gondii*.

T. gondii induz resposta imune inata potente com produção de IL-12 por neutrófilos, macrófagos e DCs. A IL-12 desempenha papel crítico na ativação da resposta imune adaptativa e na produção de IFN-γ, por células NK e linfócitos T CD4^{+} e CD8^{+}. IFN-γ, por sua vez, ativa a função microbicida em neutrófilos, DCs, macrófagos e outras células-alvo da infecção por *T. gondii*. Contudo, nesse processo a resposta inflamatória que contribui para a lesão tissular é também ativada. A ligação de PAMPs a TLRs e a sinalização via o adaptador MyD88 (fator de diferenciação mieloide) é uma das principais vias de ativação da resposta imune inata e de indução de IL-12. Animais deficientes em MyD88 não produzem IL-12 e sucumbem à infecção aguda pela cepa avirulenta ME-49 de *T. gondii* com marcante parasitismo, semelhante ao observado em animais deficientes em IL-12. A identificação de um ligante de TLR que levasse a produção de IL-12 não foi fácil, contudo contribuiu muito para o entendimento da relação *T. gondii*-hospedeiro. Porções moleculares de glicosilfosfatidilinositol (GPI) de *T. gondii* se ligam a TLR2 e TLR4, resultando na ativação de

fator nuclear κB (NF-κB) e produção de TNF-α. Camundongos duplo-deficientes em TLR2 e TLR4, mas não somente em TLR2, não produzem TNF-α em resposta a GPI de *T. gondii*, sugerindo que TLR2 e TLR4 cooperem no estabelecimento da resposta imunoprotetora. De fato, na infecção por *T. gondii*, TLR2 parece ser essencial para a produção de NO dependente de iNOS e para a regulação de síntese de TNF-α e da quimiocina CCL2/MCP-1, revelando o papel desse TLR no controle direto do parasita e da migração celular, principalmente de neutrófilos e macrófagos. Do mesmo modo, uma proteína de choque térmico (hsp70) de *T. gondii* induz a maturação de DCs via ativação de TLR4. Por outro lado, animais deficientes em TLR4 apresentam reduzida ileíte quando infectados por via oral, implicando TLR4 na formação da inflamação no intestino delgado na infecção por *T. gondii*. A deficiência de TLR9 também resulta em menor ileíte associada à reduzida resposta Th1 ao parasita no intestino delgado e na lâmina própria, sugerindo que a ativação de TLR9 contribua para a formação de reação inflamatória exacerbada. Contudo, nesses últimos modelos a participação de microrganismos comensais na ativação de TLR4 e TLR9 parece contribuir para o processo inflamatório como um todo, possibilidade que precisa ser mais bem explorada. No entanto, nenhum dos TLRs testados (TLR1, TLR2, TLR4, TLR3, TLR5, TLR6, TLR7 e TLR9) mostrou-se eficiente na indução de IL-12 durante a infecção por *T. gondii*. A demonstração de que uma fração proteica do parasita induz a produção de IL-12 em DCs, de modo dependente de MyD88, levou à identificação de profilina, uma pequena proteína que se liga à actina e regula sua polimerização em etapas cruciais da biologia do parasita, e de TLR11 como receptor da família TLR capaz de induzir IL-12, TNF-α e IL-6 em camundongos. A imunização com antígeno solúvel de *T. gondii* levou à ativação de células T $CD4^+$ específicas para profilina de forma dependente de DCs $CD8^+$, consideradas as principais fontes de IL-12 na infecção por *T. gondii* no modelo murino. Entretanto, TLR11 está ausente em humanos e a identificação do receptor de profilina – se existe – em humanos é um desafio. Este se torna mais importante à medida que a ativação de TLR11 por *T. gondii* se mostrou crítica na prevenção da resposta imunopatogênica com inflamação e destruição tissular, envolvendo IFN-γ e células NK, o que poderia tornar o receptor de profilina alvo para desenvolvimento de agonistas, como estratégia de imunorregulação na infecção humana.

A ativação pela via TLR/MyD88 é crítica para a produção de IL-12 por neutrófilos e macrófagos, contudo para as DCs existe uma via de indução de IL-12 independente da sinalização TLR/MyD88 na infecção por *T. gondii*. Na infecção oral, a produção de IL-12 por DCs da lâmina própria induz resposta imune que controla o crescimento de formas taquizoítas. Aparentemente, participam desse processo moléculas de *T. gondii* semelhantes às quimiocinas, como a ciclofilina-18 (C-18) que se liga ao receptor de quimiocina CCR5, estimulando a produção de IL-12 por DCs. É interessante notar que, após o estímulo inicial, a produção sistêmica de IL-12 pelas DCs é controlada pela modulação de CCR5 por lipoxina A4 (LXA4). LXA4 é um eicosanoide anti-inflamatório, metabólito do ácido aracdônico gerado de modo dependente da enzima 5-lipoxigenase (5-LO), que atua inibindo a função de leucotrienos e de células NK, a migração leucocitária, a produção de quimiocinas induzida por TNF-α, a translocação de NF-κB e a expressão de receptores de quimiocionas e de moléculas de adesão celular. Na infecção por *T. gondii*, LXA4 inibe a migração das DCs ativadas por antígenos do parasita e a produção de IL-12, diminuindo a resposta inflamatória na infecção aguda. Animais deficientes em 5-LO sucumbem à infecção no início da fase crônica, com produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias e infiltração celular no SNC, levando à meningite atípica. Desse modo, a inibição da resposta pró-inflamatória do tipo Th1 pode proporcionar o ambiente favorável à sobrevivência do hospedeiro, assim como à sobrevivência, propagação e transmissão do patógeno. De fato, o parasita parece ter papel ativo na modulação de CCR5, uma vez que produz LXA4 via 15-LO quando em contato com ácido aracdônico exógeno, podendo este constituir mais um mecanismo de escape de *T. gondii*, contribuindo para a cronificação da infecção em hospedeiro imunocompetente. Em conjunto, esses dados apontam para a possibilidade de receptores, além dos TLRs do hospedeiro, relacionados ao estabelecimento da resposta imune inata na infecção por *T. gondii*, participarem do processo de ativação celular,

compartimentalização da resposta imune e estabelecimento da resposta adaptativa de longa duração. Assim, a compreensão dos mecanismos de ativação e de controle-supressão da resposta imune inata poderia contribuir para a identificação de alvos para a imunorregulação e a indução de resposta imunoprotetora contra este parasita.

REGULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NA INFECÇÃO POR *TOXOPLASMA GONDII*

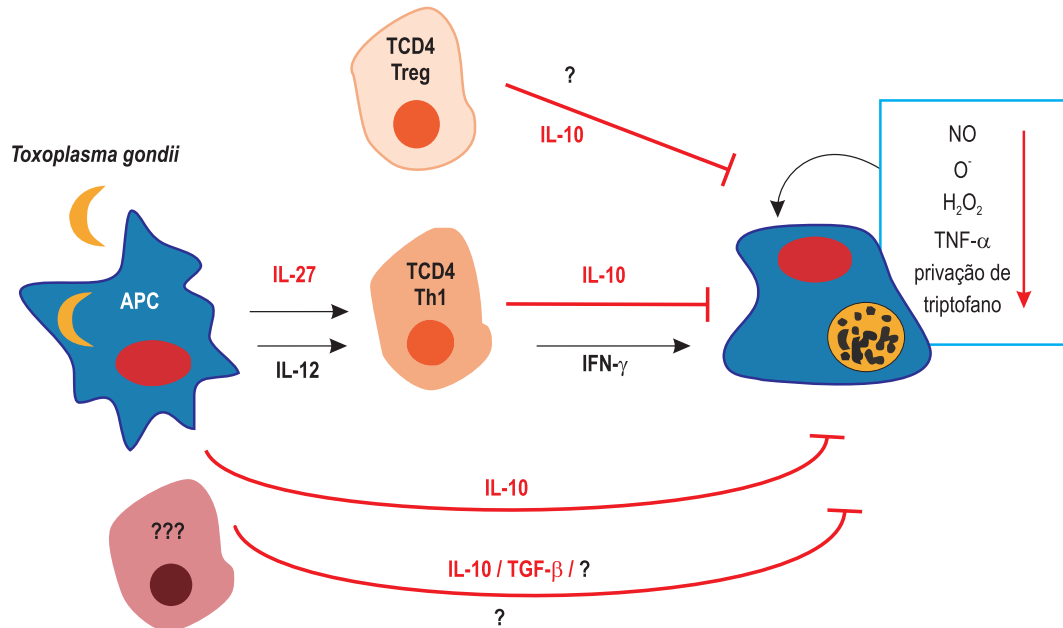
Em situações de infecção, a resposta imune inicialmente ativada resulta na expansão de populações efetoras produtoras de citocinas e anticorpos. Na resposta eficaz, o controle no invasor é alcançado, adquire-se memória imunológica e são ativados mecanismos reguladores que levam à contração das populações celulares expandidas. Nos últimos anos, muito se pesquisou sobre os mecanismos que regulam a resposta imune inata e adaptativa envolvida no controle de *T. gondii* na fase aguda da infecção. IL-10, produzida por células T $CD4^{+}Th1^{+}FoxP3^{-}$ específicas para antígenos de *T. gondii*, tem sido associada à ação anti-inflamatória, controlando a resposta imune exacerbada, marcada por alta produção de IFN-γ, IL-1 e TNF-α, que contribuem para o controle do parasita e também para a patologia na infecção por *T. gondii*. Animais deficientes em IL-10 sucumbem à infecção aguda, com níveis elevados de IL-12 e IFN-γ, com intensos processos inflamatórios e necrose no fígado e intestino delgado. Entretanto, se por um lado IL-10 é um potente imunorregulador, controlando a inflamação exacerbada, por outro lado esta citocina inibe a ação das APCs, os mecanismos microbicidas induzidos por IFN-γ e as funções efetoras de células T, como a produção de citocinas e a citotoxicidade. Favorece, portanto, a persistência do parasita e a cronificação da infecção.

A participação de células T reguladoras ($CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}$) naturais e adaptativas precisa ser mais estudada na infecção por *T. gondii*. A depleção de células $CD25^{+}$ no modelo de infecção aguda em C57BL/6 reduziu a população $CD4^{+}IFN\text{-}\gamma^{+}$ e a inflamação no fígado, mas aumentou o parasitismo e a lesão intestinal. Na fase crônica, a depleção de células $CD25^{+}$ não resultou em TE ou parasitismo no SNC. Contudo, o protocolo empregado para depleção parece ter atuado em células efetoras e não reguladoras. Dados recentes indicam que o ambiente imune altamente polarizado para Th1 durante a infecção por *T. gondii* contribui diretamente para a não funcionalidade das células T reguladoras $FoxP3^{+}$ naturais e adaptativas, podendo levar à imunopatogênese. Em quadros como a TE e a uveíte toxoplásmica, o papel das células T reguladoras no controle ou na indução da imunopatogênese ainda não foi elucidado.

Dados recentes indicam que a sinalização via TLRs resulta na ativação da família de proteínas supressoras de sinalização de citocinas (SOCS), que teriam importância crucial na limitação da resposta inflamatória, seja regulando a sinalização parácrina de IFN-γ, seja modulando a sensibilidade de macrófagos e DCs a IFN-γ e GM-CSF (fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos), modulando assim a função microbicida de macrófagos e a diferenciação das DCs. Na infecção por *T. gondii*, SCOS2 foi comprovado como um mediador intracelular crucial na ação de lipoxinas e, consequentemente, na modulação da produção de citocinas pró-inflamatórias. Animais deficientes em SOCS2 têm altos níveis de IL-12, IFN-γ e TNF-α, e ainda que controlem o número de cistos no SNC, apresentam alta frequência de células produtoras de TNF-α e de iNOS nesse tecido, apresentando alta mortalidade. A infecção por *T. gondii* também induz SCOS1, inibindo a ativação de macrófagos dependente de IFN-γ, permitindo que o parasita evada a resposta imune inata, mas evitando o estabelecimento de inflamação exacerbada.

Recentemente, IL-27, uma citocina produzida por APCs, demonstrou induzir células *naive* à proliferação e polarização para Th1, sinalizando via STAT1 e induzindo a expressão de Tbet e IL-12Rβ. IL-27 deveria apresentar papel pró-inflamatório, contudo animais deficientes em IL-12Rβ infectados por *T. gondii* apresentam controle do parasita e lesões significantes no fígado e pulmões, mas níveis de IL-10 semelhantes aos achados em animais imunocompetentes. Assim, aparentemente em situações com altos níveis de IL-12, como na infecção por *T. gondii*, IL-27 desempenha

papel regulador e anti-inflamatório, assim como faz em processos inflamatórios mediados por células Th1, Th2 e Th17. Esses dados indicam que muito ainda há para ser explorado quanto à participação de IL-27 como citocina imunorreguladora na infecção por *T. gondii*. De modo geral, os mecanismos reguladores da resposta imune exacerbada e relacionados à cronificação da infecção estão sumarizados na Figura 2.

Figura 2 – Regulação da resposta imune na infecção por *Toxoplasma gondii*

Na presença de altos níveis de interleucina (IL)-12, produzida pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), como células dendríticas (DCs) e macrófagos, ativadas pelo parasita, as APCs produzem IL-27, que atua sobre as células T CD4+ Th1, que passam a produzir IL-10 (além de interferon gama – IFN- γ). A IL-10 atua na célula alvo da infecção diminuindo os mecanismos microbicidas, levando à formação de cistos de bradizoítas. A ação de IL-10 resulta também na diminuição dos processos inflamatórios, permitindo a cronificação da infecção. Ainda não está clara a participação de outras populações celulares como fonte de IL-10 e outras citocinas imunorreguladoras, como TGF- β e outra. Também se questiona o papel de células T reguladoras (CD4+, CD25+, FoxP3+) no processo que culmina com a manutenção de cistos teciduais, diminuição da inflamação e cronificação da infecção por *T. gondii*.

Em conjunto, a ativação da resposta imune efetora e a regulação desta resposta, evitando processos patológicos, na infecção por *T. gondii*, precisam ser mais bem investigadas, contribuindo para o entendimento da imunopatogenia da infecção e proporcionando o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e imunorreguladoras, sobretudo na reativação da infecção em situações de imunossupressão.

RESPOSTA IMUNE EM MUCOSA NA INFECÇÃO POR *TOXOPLASMA GONDII*

A entrada de *T. gondii* nos hospedeiros ocorre principalmente pelo trato gastrointestinal, a maior superfície corpórea em contato com o ambiente externo, constituindo os enterócitos uma barreira física para a entrada de microrganismos. A mucosa gastrointestinal conta ainda com o tecido linfoide associado ao intestino (GALT), formado por amídalas, placas de Peyer, folículos linfoides da mucosa, células imunes da lâmina própria e linfócitos encontrados entre os enterócitos (IEL), que participam localmente do controle de patógenos que invadam a barreira física. Ainda que adquirido por ingestão de oocistos ou cistos teciduais por via oral, *T. gondii* não é considerado um enteroparasita,

pois rapidamente invade o epitélio intestinal e se dissemina por outros tecidos. Do processo de invasão participam moléculas do parasita, seja de superfície (como SAG1/p30) ou de micronema (como MIC2 e MIC3), e moléculas do hospedeiro, como a molécula de adesão intercelular (ICAM)-1.

A entrada de *T. gondii* por via oral resulta em potente resposta imune inata na mucosa, deflagrada possivelmente pela interação mediada por TLRs. Esta resposta imune é orquestrada por células de origem parenquimatosa, como as células epiteliais intestinais, e por células do sistema hematopoiético, como macrófagos, DCs e linfócitos, que, junto com neutrófilos e eosinófilos, participam do controle do parasita. Os enterócitos, quando ativados, atuam diretamente no controle de *T. gondii* pela produção de NO, além de secretarem citocinas e quimiocinas que participam da quimiotaxia de populações de células imunes como neutrófilos, macrófagos, DCs e linfócitos. Neutrófilos estão entre as primeiras células a entrarem em um sítio de infecção por *T. gondii*, de modo dependente da expressão de CXCR1 e CXCR2 (receptores de CXCL8/IL-8) em humanos e de CXCR2 (receptor de CXCL1/KC CXCL2/MIP-2) em camundongos. Os neutrófilos exercem sua função microbicida de forma direta e também de modo independente da produção de ROIs. Além de contribuir para o controle do parasita, os neutrófilos exercem papel imunorregulador, evitando a resposta imune Th1 e Th2 exacerbada. Quando estimulados por moléculas de *T. gondii*, neutrófilos humanos e murinos produzem IL-12, TNF-α e uma série de quimiocinas, como CCL3/MIP-1α, CCL4/MIP-1β, CCL5/RANTES e CCL20/MIP-3α. Desta forma, neutrófilos podem participar do recrutamento e ativação de outras populações celulares, como macrófagos e DCs, para sítios de infecção por *T. gondii* e desempenhar papel central na conexão da resposta imune inata e adaptativa no trato gastrointestinal.

Os macrófagos exercem função microbicida de forma inata, sendo ativados por IFN-γ, cuja fonte podem ser as células NK ou linfócitos $CD4^+$ Th1 e $CD8^+$ Tc1 ativados, resultando na produção de TNF-α e de ROIs, como NO, potente microbicida para *T. gondii*, e atuando de forma dependente de membros da família das p47GTPases. No trato gastrointestinal, IFN-γ também induz atividade microbiostática independente de NO, como a privação de triptofano e ferro, deletéria à replicação de *T. gondii* em macrófagos e enterócitos.

A interação CD40/CD154 (CD40L), envolvida na ativação de macrófagos, na produção de IL-12 e subsequentemente na ativação de linfócitos e na produção de IFN-γ, mostrou-se importante para o estabelecimento da resposta inflamatória de mucosa intestinal que leva ao controle da infecção oral de camundongos por *T. gondii*. A interação CD40/CD154 também se mostrou importante na ativação da resposta microbicida de macrófagos, mesmo na ausência de IFN-γ e na produção de ROIs, mas na dependência de TNF-α. Contudo, *T. gondii* subverte o sistema microbicida de macrófagos de forma sofisticada, como pela ativação de STAT3, que suprime a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12 e TNF-α) e participa de funções imunorreguladoras. Dados mais recentes indicam que durante a invasão de células do hospedeiro, moléculas solúveis de róptrias, como ROP16, são liberadas no citoplasma, alcançando o núcleo e eventualmente interferindo nas vias de sinalização como STAT3/6, moléculas-chave no estabelecimento da resposta imune. Aparentemente, parasitas em apoptose também contribuem para a manutenção da infecção em macrófagos, de modo ainda não definido, de forma que macrófagos podem funcionar como cavalos de troia, disseminando a infecção. Por outro lado, ao manterem parasitas vivos em seu citoplasma por longo tempo, os macrófagos podem contribuir para a apresentação de antígenos e, assim, para a geração e manutenção da memória imunológica.

Enterócitos podem atuar como APCs, uma vez que após infecção por *T. gondii* expressam CD40, CD1d e moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC-II). Contudo, aos enterócitos faltam as moléculas coestimuladoras CD80 e CD86, sendo eles APCs menos potentes que as DCs. No trato intestinal, as DCs imaturas se localizam nas placas de Peyer e na lâmina própria. Após a infecção oral por *T. gondii*, a maioria das DCs da lâmina própria apresenta fenótipo ativado, com alta densidade de expressão de CD40, MHC-II, CD80 e CD86. Porém, não está claro como as DCs adquirem antígenos de *T. gondii*: se diretamente no lúmen do intestino; se capturam antígenos

que passam através das células epiteliais; se via digestão de enterócitos infectados apoptóticos; ou se ao serem diretamente infectadas. *T. gondii* pode ativar e eficientemente parasitar DCs humanas e de camundongos que passam a participar do processo de disseminação da infecção, como fazem outras células, atuando como cavalos de troia. De fato, após a infecção oral de camundongos com oocistos, DCs $CD11c^{+}$ são encontradas parasitadas na lâmina própria do intestino, nas placas de Peyer e nos linfonodos mesentéricos, enquanto no sangue os parasitas são encontrados em monócitos $CD11c^{-}$ e $CD11b^{+}$.

Outras populações celulares, como as células NK, NKT (*natural killer T cells*) e linfócitos, sejam migrantes de órgãos linfóides periféricos (células T $CD4^{+}$ e $CD8^{+}$), sejam IELs, atuam no controle da infecção por *T. gondii* no trato gastrointestinal, principalmente via produção de IFN-γ. Contudo, estas populações celulares também desempenham papel na formação da ileíte. Os IELs, a maioria $CD8^{+}$ com repertório restrito de receptor de antígenos (*T cell receptor*, TCR), migram de forma dependente da interação CCR5 e CCL3/MIP-1α e se localizam próximo aos enterócitos infectados, onde atuam como células citotóxicas, levando enterócitos infectados à morte. Por outro lado, os IELs, via secreção de TGF-β, regulam a função de células $CD4^{+}$ Th1 e diminuem a inflamação.

Por último, a microflora intestinal também pode contribuir para o curso da infecção por *T. gondii*, ativando moléculas como TLRs ou levando estes a tolerância ou estado de não resposta. Por outro lado, a infecção por *T. gondii* pode alterar a composição da microflora intestinal e até bloquear a resposta de TLRs a estímulos produzidos por bactérias da microflora, como lipopolissacarídeo (LPS). Desta forma, um novo cenário de ativação e regulação da resposta imune da mucosa, e possíveis consequências na resposta imune sistêmica, começa a ser descortinado, tendo como modelo de estudo a infecção por *T. gondii*.

RESPOSTA IMUNE NO SNC NA INFECÇÃO TOXOPLÁSMICA

A toxoplasmose ganhou maior visibilidade médica em virtude do elevado número de pacientes imunocomprometidos com Aids que frequentemente desenvolviam TE antes do desenvolvimento do coquetel anti-HIV, que contribui para o controle do vírus e melhora do *status* imunológico dos pacientes. A TE é ainda preocupante em casos de pacientes portadores de vírus resistentes ao coquetel antirretroviral e de pacientes imunocomprometidos por quimioterápicos. O desenvolvimento da TE também parece ser determinado pelo tipo de cepa de *T. gondii*. Em animais imunossuprimidos por tratamento com anti-IFN-γ, as cepas do tipo II induzem TE, mas não as cepas do tipo III. Já em humanos, as cepas do tipo II são preferencialmente isoladas de pacientes com Aids, imunossuprimidos com TE não associada à Aids e com a forma congênita. A TE é caracterizada pela presença de múltiplos abscessos cerebrais, contendo material necrótico, cercados por numerosos parasitas livres no parênquima, células parasitadas e escassa quantidade de células inflamatórias mononucleares. Em camundongos imunocompetentes infectados por *T. gondii* suscetíveis à TE, os infiltrados inflamatórios presentes no SNC são formados por macrófagos e células T e B. De modo interessante, a ativação microglial é maior em animais imunocompetentes do que em camundongos SCID, deficientes em linfócitos T e B, que apresentam TE semelhante à observada em alguns pacientes com Aids.

Durante muitos anos considerou-se o SNC um sítio imunoprivilegiado, com pouco acesso de células imunes pela presença da barreira hematoencefálica, o que explicaria a persistência silenciosa de parasitas, como *T. gondii*, neste sítio. Contudo, nos últimos anos constatou-se que o SNC é um sítio imunoespecializado, com resposta imune compartimentalizada, da qual participam células do ambiente nervoso, como astrócitos, micróglias, oligodendrócitos e até mesmo neurônios. Na infecção aguda por *T. gondii*, leucócitos $CD11b^{+}$ funcionam como cavalos de troia carreando formas taquizoítas para o SNC, que após proliferação formam cistos de bradizoítas persistentes na fase crônica. Uma variedade de células do SNC pode ser infectada por *T. gondii*, como astrócitos, micróglias e neurônios

no cérebro e células de Purkinjen no cerebelo. Também no SNC, IFN-γ é crucial no controle de *T. gondii* na fase aguda, assim como para a manutenção da latência dos cistos de bradizoítas e prevenção da reativação na infecção crônica. Além de ter como fonte as células NK e células T ($CD4^+$ e $CD8^+$) presentes nos infiltrados inflamatórios no SNC, as micróglias e macrófagos imigrantes da periferia também são fontes de IFN-γ na infecção por *T. gondii*. Se por um lado micróglias, astrócitos e neurônios produzem citocinas, quimiocinas e fatores microbicidas que contribuem para o controle do parasita, por outro suprimem a resposta inflamatória, o que contribuiria para a persistência de *T. gondii* e o estabelecimento da infecção crônica.

Células $CD4^+$ e $CD8^+$, recrutadas no cérebro durante a infecção em camundongos, produzem IL-2, IL-10, TNF-α e IFN-γ, sendo IL-4 produzida somente por células $CD4^+$. Parece, portanto, que as células T $CD4^+$ exibem fenótipos Th1 e Th2, enquanto as células T $CD8^+$ exibem fenótipo Tc1. Ambas as subpopulações de células T ($CD4^+$ e $CD8^+$) são essenciais à imunidade no SNC na infecção crônica, pois em camundongos a depleção simultânea destas, mas não das subpopulações isoladas, levou à TE.

Quanto ao papel de citocinas, IL-1β expressa por células $CD8^+$ e células do parênquima cerebral, além de atuar sinergicamente com IFN-γ no controle do *T. gondii*, exerce atividades fisiológicas, como a indução da produção de substâncias neurotróficas, importantes para o crescimento e desenvolvimento de neuritos, contribuindo para o remodelamento e plasticidade no SNC. Observa-se também que algumas citocinas produzidas nesse tecido não estão somente associadas a reações imunológicas em situação de injúria. IL-6 produzida por macrófagos pode reverter a ação de IFN-γ e IL-1, que induz controle do parasita em astrócitos e micróglias, e contribuir para a reativação da infecção e para a TE na Aids. Ao contrário, sugere-se que TNF-α desempenhe papel importante na prevenção da progressão da TE. Nesse contexto, em camundongos suscetíveis à TE o tratamento com anticorpos neutralizantes anti-TNF-α aumenta a gravidade da encefalite. Vários estudos *in vitro* apontam que IFN-γ é a principal citocina indutora de TNF-α em células da linhagem macrofágica, e ambas apresentam efeito sinérgico na ativação de células gliais *in vitro* e na atividade microbicida de macrófagos e da micróglia. Por outro lado, a neutralização de IL-10 durante a TE crônica leva ao aumento na eliminação dos parasitas no cérebro. De forma similar, de estudos com camundongos $IL\text{-}4^{-/-}$ deduz-se que esta citocina também seja importante no controle da resposta imune celular durante a infecção por *T. gondii*, embora a ausência de IL-4 tenha sido benéfica em outro modelo experimental, pois resultou em maior controle do parasita, sugerindo que o contexto geral da inflamação seja determinante para o destino final desta e do controle da infecção.

Um dos resultados da ativação de micróglias por IFN-γ é a produção de NO, dependente de iNOS, e controle de *T. gondii*. Astrócitos humanos, mas não de camundongos, ativados por IFN-γ e IL-1β também controlam o parasita mediante a produção de NO. Embora seja atribuído ao NO um marcante efeito neurotóxico, na infecção por *T. gondii* a morte neuronal não é uma característica notável, diferindo de outras patologias inflamatórias do SNC. Em estudos *in vitro* de cocultivo de micróglias e neurônios, observou-se que a prostaglandina E2 produzida por astrócitos infectados por *T. gondii* induz a produção de IL-10, de forma dependente de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc), por micróglias previamente ativadas por IFN-γ. Esta IL-10 atua de forma autócrina, diminuindo a produção de NO, o que favorece o crescimento de neuritos. Desse processo também participa TGF-β, produzido por micróglias infectadas por *T. gondii*, que inibe a síntese de iNOS e, consequentemente, a produção de NO, atuando de forma autócrina e somente nas micróglias infectadas. Assim, por um lado, tanto IL-10 quanto TGF-β produzidos por micróglias ativadas por IFN-γ ou infectadas contribuem para diminuir o potencial neurotóxico de produtos dessas células, como NO; por outro lado, contribuem para a manutenção 'silenciosa' do parasita no SNC.

Desde a descrição inicial por Minto e Robert na década de 1950, desordens neurológicas e complicações psiquiátricas, como desorientação, psicoses com características esquizofrênicas, ansiedade e depressão, têm sido associadas à

infecção por *T. gondii*. Mais recentemente, esquizofrenia e epilepsia foram diretamente associadas a essa infecção. Alterações de comportamento em hospedeiros intermediários, como ratos e camundongos, levaram à 'hipótese da manipulação', segundo a qual *T. gondii* induziria alterações de comportamento no hospedeiro intermediário, que ficaria mais vulnerável à predação, contribuindo para a manutenção de ciclo tão complexo, com necessidade de passagem do parasita por hospedeiros definitivos, os felinos. As alterações de comportamento, como maior atividade motora ou alteração da capacidade sensorial, podem ser resultados diretos da liberação de produtos do parasita, que atuariam, por exemplo, no sistema límbico. Nesse sentido, algumas áreas do SNC são preferencialmente parasitadas por *T. gondii*. Contudo, a presença física do parasita não parece ser suficiente, sendo necessária a presença de neurotransmissores para indução-manutenção das alterações comportamentais. Durante a infecção por *T. gondii* a expressão de neurotransmissores, como norepinefrina e dopamina, fica alterada, o que poderia contribuir para as alterações comportamentais. Dopamina é uma molécula-chave na interação entre os sistemas nervoso e imune, atuando de forma autócrina e parácrina e modulando atividades imunes como a ativação de células T. Por outro lado, células inflamatórias, como células T e macrófagos, ao entrarem no SNC e gerarem lesões como a meningite causada por *T. gondii*, podem contribuir para a alteração de comportamento do hospedeiro, atuando como fontes de citocinas inflamatórias, lesionando as células nervosas em áreas importantes do SNC ou produzindo neurotransmissores. Uma vez mais, *T. gondii* mostra-se um excelente modelo para a compreensão das interações neuroimunes envolvidas na fisiologia e em quadros patológicos do SNC, com comprometimento neurológico, motor ou comportamental.

TOXOPLASMOSE OCULAR: MUITO A DESVENDAR

A toxoplasmose ocular (TO) ou retinocoroidite toxoplásmica, caracterizada por intensa inflamação, é reconhecida como uma das principais complicações associadas à infecção por *T. gondii* congênita ou adquirida após o nascimento, podendo levar à cegueira. Por muito tempo, os olhos foram considerados um sítio imunoprivilegiado devido à existência da barreira hemato-ocular, à falta de sistema de drenagem linfática e à ausência de APCs profissionais. Contudo, evidências recentes mostram ser este um sítio imunoespecializado no qual ocorre apresentação de antígeno, produção de citocinas e de anticorpos, mas que possui um sistema de imunorregulação bem estabelecido. A infecção peroral de fêmeas de camundongos que resulta na forma congênita ou a infecção subcutânea de neonatos de camundongos com cepas avirulentas de *T. gondii* reproduzem diversos aspectos da infecção humana, incluindo a TO. Esta é formada principalmente por linfócitos T $CD4^{+}$, ainda que células T $CD8^{+}$ e linfócitos B também componham a inflamação. Na retina de animais infectados, estes intensos infiltrados inflamatórios estão associados a altos níveis de IFN-γ e IL-6 e baixos níveis de IL-10 no humor aquoso. Por outro lado, animais não infectados apresentam baixos níveis de IFN-γ e IL-6 e altos níveis de IL-10, sugerindo que o desequilíbrio no perfil de citocinas contribui para a formação da inflamação e para a lesão na retina dos animais infectados por *T. gondii*. Altos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-12, TNF-α e IFN-γ foram implicados na patologia ocular em humanos e no modelo murino. Por outro lado, GM-CSF, secretado por células epiteliais humanas de retina infectadas por *T. gondii*, foi implicado na imunorregulação da TO, mostrando que o microambiente do tecido pode atuar diretamente no processo, independente das células imunes que infiltram esse tecido.

Estudos recentes indicam que a gravidade da TO experimental está relacionada à intensidade de inflamação e identificam a presença de IL-17 no ambiente ocular como marcador de gravidade. Aparentemente, IL-23 produzida por DCs induz a proliferação de células produtoras de IL-17 (Th17) e IL-27. Na infecção por *T. gondii*, células Th17 (também induzidas por IL-1, IL-6 e TGF-β) parecem ter papel central na formação da inflamação ocular e geração da TO. Ainda que aparentemente contraditório, trabalho recente mostra que IFN-γ tem papel protetor na TO controlando

o parasita e modulando a ativação de células Th17, enquanto IL-27 modula a função de células Th17 e Th1 e atua como imunorregulador na infecção por *T. gondii*. Em síntese, na infecção por *T. gondii* citocinas produzidas por células Th1 e Th17 estariam relacionadas à patogenia da TO, enquanto IL-10, TGF-β e IL-27 são citocinas-chave na imunorregulação da inflamação e na manutenção homeostática de sítios como o SNC e o ambiente ocular. Pelo que se pode observar, células T reguladoras ($CD4^+$, $CD25^+$, $FoxP3^+$) também controlam a inflamação no sítio ocular, protegendo contra os efeitos colaterais da inflamação induzida pela presença do parasita. Contudo, a participação de células T reguladoras na TO precisa ser mais bem explorada.

Os quadros epidemiológicos de prevalência da TO sugerem a associação de virulência das cepas circulantes na região estudada e da genética do hospedeiro como influentes diretos do quadro final da TO. Em estudo recente de polimorfismos gênicos de base única (SNPs) das moléculas TLR2, TLR4, TLR5 e TLR9 em famílias brasileiras em região de alta frequência de TO, observou-se associação entre a presença do alelo C da região rs352140 do TLR9 e a retinocoroidite toxoplásmica, sugerindo que a ativação deste TLR durante a infecção por *T. gondii* resulte em resposta inflamatória, levando a formas patológicas graves como a TO. Contudo, estudos *in vitro* sugerem que o parasita não ative diretamente TLR9, revelando que muito ainda há por compreender na fisiopatogenia da TO.

VACINAS PARA TOXOPLASMOSE: REALIDADE PRÓXIMA?

A maioria dos indivíduos infectados por *T. gondii* desenvolve imunidade que resulta em equilíbrio parasita-hospedeiro e proteção (pelo menos parcial) contra a reinfecção. Assim, o desenvolvimento de vacina para uso veterinário ou humano como estratégia para controlar a multiplicação do parasita e prevenir a doença é uma questão teoricamente plausível. Uma vacina veterinária teria como objetivos a prevenção da toxoplasmose congênita, a redução de cistos em carne para consumo humano e a diminuição da eliminação de oocistos por gatos. As estratégias iniciais para o desenvolvimento de vacinas veterinárias utilizaram taquizoítas vivos (cepas de baixa virulência, mutantes da cepa virulenta RH quimicamente induzidos, taquizoítas irradiados) e imunização com os antígenos de *T. gondii*, na forma nativa purificada ou recombinante, em combinação com adjuvantes. Embora esses tipos de vacina reduzam o número de cistos em modelos experimentais, não impedem que as formas encistadas continuem seu ciclo de vida. Até o momento somente a vacina utilizando a cepa S48 atenuada, que previne o aborto em ovinos, mas não induz imunidade duradoura, foi licenciada para uso veterinário. Contudo, esta vacina tem alto custo e baixa durabilidade em estoque. Por usar patógeno vivo, podendo ter sua virulência restaurada, esta vacina não é viável para uso em humanos. Considerando populações-alvo para o uso de vacina imunoprofilática ou imunoterapêutica anti-*T. gondii*, como as mulheres em idade fértil e pacientes imunocomprometidos, as estratégias mais indicadas seriam a utilização de antígenos na forma nativa ou recombinante. Entretanto, esses antígenos apresentam como principal desvantagem a indução de resposta imune de curta duração, e requerem o uso de adjuvantes. Neste sentido, a compreensão dos mecanismos moleculares de reconhecimento inato e adaptativo do *T. gondii* pode contribuir para a escolha racional de adjuvantes a serem usados em uma preparação vacinal dirigida a este parasita.

O aumento dos rebanhos de suínos, ovinos e caprinos, assim como o desenvolvimento da avicultura, torna a produção de uma vacina veterinária atraente economicamente e como fonte de controle da infecção humana por carnes contaminadas. O conjunto de resultados presentes na literatura indica que a resposta imune celular, com produção de IFN-γ e a ativação de células T $CD4^+$ e $CD8^+$, é crucial para o controle da infecção primária, para a sobrevivência à fase aguda da infecção e para a geração da resposta imunoprotetora. Além disso, a resposta imune humoral, com a produção dos anticorpos específicos, é mais relevante na defesa do hospedeiro aos desafios secundários. Assim, a princípio o ideal para a eficácia de uma vacina anti-*T. gondii* seria a ativação desses mecanismos efetores de forma

ampla e duradoura. Dessa forma, alguns requisitos devem ser preenchidos para o desenvolvimento de uma vacina contra *T. gondii*, tais como: a seleção de antígenos que sejam reconhecidamente indutores de imunidade dependente de células T e geradores de memória imunológica e que estejam, preferencialmente, presentes em formas taquizoítas e bradizoítas; e a adição de adjuvantes, racionalmente planejados, com base no conhecimento dos mecanismos de imunoproteção e imunopatogenia. SAG1/p30 (34kDa), proteína de superfície de taquizoítas, é possivelmente o antígeno mais imunogênico de *T. gondii* já descrito. Este antígeno induz resposta humoral (com anticorpos IgM, IgA e IgG) e celular, com perfil Th1 em animais infectados, e estimula a produção de IFN-γ e a atividade citotóxica mediada por células T $CD8^+$ em culturas de linfócitos humanos. SAG1/p30 já foi explorado como preparação vacinal na forma de proteína nativa, recombinante inteira ou em fragmentos, incorporada a lipossoma, com alúmen ou saponina Quil A, com IL-12 e outros adjuvantes, administrados por via subcutânea ou intranasal, mantendo a propriedade imunogênica e estimulando resposta imunoprotetora em camundongos. SAG1/p30 foi também clonado em adenovírus e usado sozinho ou associado a SAG2 e SAG3, mostrando-se imunogênico, mas com baixo potencial protetor. As proteínas nativas de grânulos GRA2, GRA4, GRA5, GRA6 e GRA7 também induziram resposta imune de tipo Th1 e proteção significante em camundongos. Antígenos recombinantes como GRA1 expressa em BCG e a GRA4 expressa em *Escherichia coli* induziram proteção parcial em camundongos ao desafio com cepa cistogênica. Por outro lado, GRA1 usada em BCG como vetor e 85A como antígeno promotor não foi eficiente para induzir resposta imunoprotetora. No caso de GRA4, a expressão de uma proteína de fusão GRA4-glutationa-S-tranferase (GST-GRA4), administrada com toxina colérica, induziu resposta imune de tipo Th2, com níveis elevados de IgG1 e IgG2b em comparação aos de IgG2a, além de IgA em secreção intestinal, e reduziu o número de cistos teciduais. Nos últimos anos, estratégias utilizando proteínas purificadas e recombinantes mostraram que antígenos de superfície, como SAG1/p30, Gp28, p23, p63 e p22, a proteína de róptria ROP2/p54 (presente em três estágios do ciclo do parasita), os antígenos de grânulos GRA1, GRA4 ou GRA7, assim como os de micronemas MIC-1 e MIC4, quando clonados inteiros ou como fragmentos, são imunogênicos e apresentam potencial para compor uma vacina. Nestes casos, o uso de adjuvantes e/ou a via de administração da preparação vacinal foram determinantes para o grau de proteção alcançado.

As vacinas gênicas ou vacinas de DNA mimetizam a infecção natural, ativando linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ assim como a produção de anticorpos, e contêm motivos CpGs repetitivos que funcionam como imunoestimuladores ou adjuvantes. A maioria das vacinas de DNA contendo genes de *T. gondii* induziu resposta imune específica e foi protetora, com diminuição no número de cistos, aumento na taxa de sobrevivência ou retardo na mortalidade, dependendo do modelo de desafio ou o *endpoint* considerado. Algumas dessas preparações foram utilizadas com adjuvantes, como GM-CSF e IL-12, que potencializaram sua ação. As estratégias mais promissoras neste campo surgiram com a utilização de preparações vacinais de DNA em combinação (coquetel). As pioneiras, contendo uma biblioteca genômica de *T. gondii* e o coquetel SAG-1/p30+ROP2/p54, foram imunogênicas e induziram proteção de longa duração no modelo murino ao desafio com a cepa RH, aumentando a sobrevida dos animais. Outras preparações em coquetel, como SAG-1/p30+GRA4, SAG-1/p30+GRA4 e GRA1+GRA7+ROP2/p54, reduziram o número de cistos no SNC e/ou aumentaram a sobrevida no modelo murino. Até o momento, preparações de construções de DNA de genes codificadores de proteínas de superfície, róptrias, micronemas e grânulos, assim como proteínas de choque térmico, mostraram ter potencial vacinal, sozinhas ou em coquetel, com ou sem adjuvantes. Por outro lado, diversos outros microrganismos atenuados, como vacínia, adenovírus, BCG e *Salmonella typhimurium*, têm sido testados como vetores para vacinas contra *T. gondii*, sozinhos ou em esquemas de *prime-boost* heterólogo com vacina de DNA, apresentando potenciais imunogênicos e imunoprotetores variados. Contudo, poucas são as preparações vacinais testadas nos alvos de uma vacina comercial, como ovelhas, porcos e gatos. Destas, raras diminuíram o número de cistos teciduais em porcos (como o coquetel de vacina de DNA GRA1 + GRA7 + GM-CSF) ou reduziram a liberação

de oocistos por gatos (como a cepa mutante T-263 ou o extrato de róptrias + adjuvante Quil A), reforçando a importância da vacina como estratégia para diminuir a contaminação da carne usada na alimentação humana e a contaminação ambiental.

Diversos antígenos de *T. gondii* já foram identificados por possuir capacidade imunogênica, induzir imunidade protetora, constituindo prováveis candidatos a compor preparações vacinais para uso em animais ou mesmo em humanos. Contudo, ainda permanecem como desafios (i) a seleção de antígenos, que de preferência sejam expressos em diferentes estágios do ciclo de vida e conservados em diferentes cepas; e (ii) a apresentação destes de maneira apropriada a induzir resposta imunoprotetora de longa duração e em populações de hospedeiros geneticamente diferentes.

ASPECTOS NÃO BENÉFICOS DA RESPOSTA IMUNE NA TOXOPLASMOSE: DESAFIOS ALÉM DA INFLAMAÇÃO

T. gondii é um dos raros parasitas que atravessam a placenta. Quando a infecção é adquirida durante a gestação, pode resultar em abortos e más-formações, cuja gravidade depende do estágio gestacional. Em estudos recentes com camundongos, considerando as diferenças quanto à ontogênese e ao sistema imune humano, observou-se que IFN-γ participa de forma dualística na infecção primária durante a gestação. Ao passo que apresenta um papel benéfico no controle da infecção, IFN-γ também contribuiria para o aumento da transmissão placentária, aumentando a expressão de ICAM-1 nas células trofoblásticas e favorecendo a interação com monócitos infectados. Além disso, IFN-γ atuaria diretamente no feto, causando-lhe injúrias. Ainda que mais estudos sejam necessários, esse dado é crucial e leva ao questionamento do desenho de vacinas proposto atualmente, tendo a produção de IFN-γ como alvo e marcador da resposta imunoprotetora.

CONCLUSÃO

A infecção por *T. gondii* constitui um excelente modelo de estudo para a compreensão dos desafios do entendimento do *cross-talk* dos sistemas nervoso e imune. Além disso, a integração dos estudos da resposta imune em pacientes e modelos experimentais pode contribuir para o entendimento dos mecanismos pelos quais um patógeno se torna um parasita eficiente, convivendo em equilíbrio com seu hospedeiro, e para o desenvolvimento de estratégias que favoreçam este equilíbrio, como as vacinas.

REFERÊNCIAS

BUZONI-GATEL, D. *et al*. Mucosal defenses against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. *Cellular Microbiology*, 8: 535-544, 2006.

CARRUTHERS, V. B. & SUZUKI, Y. Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. *Schizophrenia Bulletin*, 33: 745-751, 2007.

CORREA, D. *et al*. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. *Parasite Immunology*, 29: 651-660, 2007.

DALPKE, A. *et al*. Regulation of innate immunity by suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins. *Immunobiology*, 213: 225-235, 2008.

DUBEY, J. P. & SU, C. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 190-195, 2009.

DZIERSZINSKI, F. S. & HUNTER, C. A. Advances in the use of genetically engineered parasites to study immunity to *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunology*, 30: 235-244, 2008.

EGAN, C. E. *et al*. Functional aspects of Toll-like receptor/MyD88 signaling during protozoan infection: focus on *Toxoplasma gondii*. *Clinical and Experimental Immunology*, 156: 17-24, 2009.

GARWEG, J. G. & CANDOLFI, E. Immunopathology in ocular toxoplasmosis: facts and clues. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 211-220, 2009.

INNES, E. A. *et al*. Veterinary vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 246-251, 2009.

JONGERT, E. *et al*. Vaccines against *Toxoplasma gondii*: challenges and opportunities. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 252-266, 2009.

LANG, C.; GROSS, U. & LÜDER, C. G. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Research*, 100: 191-203, 2007.

MACHADO, F. S. & ALIBERTI, J. Role of lipoxin in the modulation of immune response during infection. *International Immunopharmacology*, 8: 1.316-1.319, 2008.

MILLER, C. M. *et al*. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology*, 39: 23-39, 2009.

O'GARRA, A. & VIEIRA, P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nature Reviews Immunology*, 7: 425-428, 2007.

PFAFF, A. W. *et al*. Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 201-210, 2009.

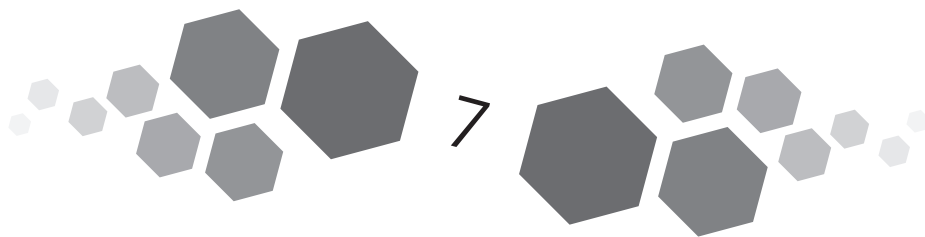
PFAFF, A. W. *et al*. Cellular and molecular physiopathology of congenital toxoplasmosis: the dual role of IFN-gamma. *Parasitology*, 134: 1.895-1.902, 2007.

SILVA, R. C. & LANGONI, H. *Toxoplasma gondii*: host-parasite interaction and behavior manipulation. *Parasitology Research*, 105: 893-898, 2009.

VIOLA, A. & LUSTER, A. D. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 48: 171-197, 2008.

WEISS, L. M. & DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. *International Journal for Parasitology*, 39: 895-901, 2009.

YAROVINSKY, F. Toll-like receptors and their role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunology Letters*, 119: 17-21, 2008.

7

Quimioterapia Experimental

Rossiane Claudia Vommaro • Érica dos Santos Martins-Duarte • Wanderley de Souza

A pesquisa de agentes quimioterápicos para o tratamento da toxoplasmose teve início com a descoberta de *Toxoplasma gondii* como causa de infecções humanas em 1939. O tratamento com a combinação de sulfadiazina (inibidor da di-hidropteroato sintetase) e pirimetamina (di-hidrofolato redutase) foi introduzido há cerca sessenta anos, e esta combinação ainda é utilizada como a primeira escolha para tratar a toxoplasmose (Eyles, 1953).

Embora a combinação de sulfadiazina e pirimetamina produza resultados satisfatórios nos casos agudos da doença, o tratamento tem caráter supressivo e age somente nessa fase (na presença de taquizoítas), sendo ineficaz no combate da fase crônica (com bradizoítas encistados). Além disso, a combinação de sulfadiazina e pirimetamina apresenta alta toxicidade para o hospedeiro, o que pode levar ao abandono do tratamento, com consequências particularmente graves em pacientes com Aids. Embora não haja nenhuma descrição de resistência adquirida aos antifolatos por *T. gondii*, alguns pacientes com toxoplasmose encefálica não respondem a esse tratamento (Luft *et al.*, 1993).

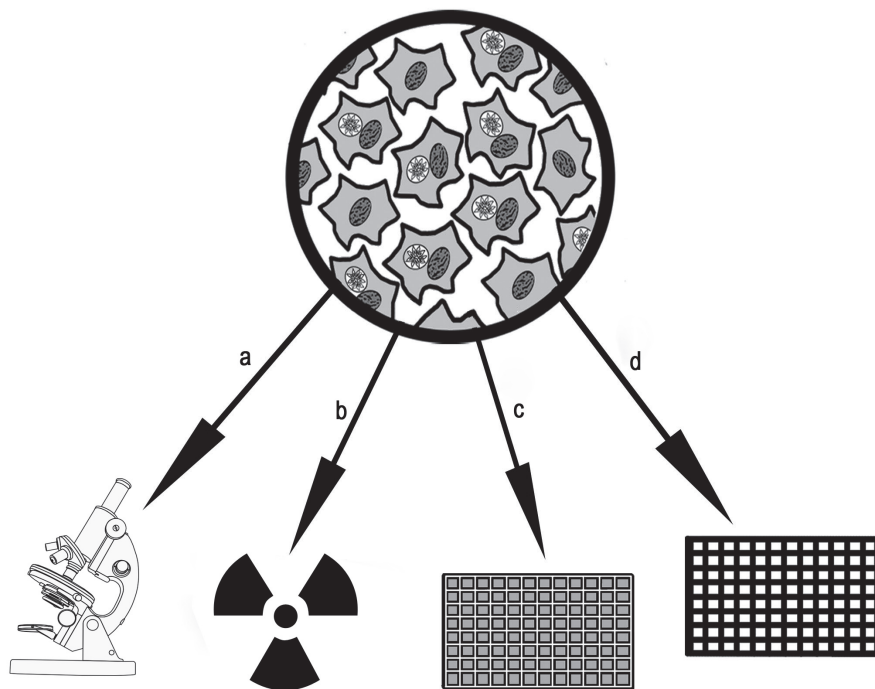
Entre outros fármacos empregados no tratamento da toxoplasmose, incluem-se clindamicina, trimetoprim-sulfametoxazol e atovaquona, que também apresentam diversos efeitos adversos, levando muitos pacientes a abandonar o tratamento (Luft *et al.*,1993). Assim, a descoberta de novos agentes quimioterápicos mais eficazes para o tratamento da toxoplasmose é de extrema urgência.

Um esforço considerável vem sendo realizado por vários pesquisadores na área de quimioterapia experimental para melhorar as metodologias empregadas na identificação de novos alvos e no estudo de novos compostos ou novas combinações terapêuticas que apresentem atividade anti-*T. gondii*. Esses estudos têm como finalidade encontrar compostos ou combinações que atinjam seletivamente o parasita e não o hospedeiro.

Neste capítulo serão abordadas as metodologias mais usadas na avaliação *in vitro* e *in vivo* de novos compostos, assim como alguns grupos de fármacos e alvos mais promissores que vêm sendo estudados.

METODOLOGIAS EMPREGADAS NO ESTUDO *IN VITRO*

O ensaio *in vitro* é uma etapa essencial para a identificação de compostos com atividade antiparasitária. A avaliação do efeito inibitório de diferentes compostos na proliferação de *T. gondii* pode ser feita por meio de diferentes metodologias (Figura 1). Estas incluem desde a observação da proliferação por microscópio óptico ao uso de ensaios em larga escala utilizando cepas fluorescentes.

Figura 1 – Metodologias empregadas na análise *in vitro* do efeito de diferentes compostos na proliferação de *Toxoplasma gondii*

a) Contagem da carga parasitária por microscopia óptica; b) incorporação de $[^3H]$ uracila; c) Elisa; d) parasita expressando proteína fluorescente.

A facilidade com que *T. gondii* pode ser cultivado tanto *in vitro* quanto em modelos murinos facilita a avaliação dos compostos eficazes e das propriedades farmacológicas desejáveis.

Manutenção de Taquizoítas

A cepa de *T. gondii* mais empregada no estudo *in vitro* é a cepa RH, de fácil cultivo. Isolada em 1938 em Ohio, nos Estados Unidos (Sabin, 1941), desde então é mantida em vários laboratórios mediante passagens em camundongos ou em cultura de células.

Em cultura de células a manutenção é feita pela infecção de um novo frasco de cultura com uma pequena alíquota de sobrenadante proveniente de células recentemente lisadas por taquizoítas e meio contendo soro fetal bovino (SFB). A cultura recém-infectada deve ser monitorada ao microscópio óptico para acompanhamento do desenvolvimento do parasita até a sua lise, para uma nova passagem. Quanto maior o índice de infecção da cultura, mais rápida será a obtenção de parasitas no sobrenadante. Pela capacidade de *T. gondii* infectar, virtualmente, qualquer tipo celular nucleado

proveniente de animais de sangue quente, qualquer linhagem celular poderá ser utilizada. As mais empregadas nesse tipo de manutenção são geralmente aquelas que levam à formação de células bem espraiadas, como os fibroblastos, permitindo um alto índice de infecção e proliferação. Para a utilização em experimentos de interação, recomenda-se filtrar o sobrenadante em membranas com poros de 3 μm para obtenção dos parasitas livres de restos celulares.

Em camundongos (por exemplo, suíço ou BALB/c) os taquizoítas são mantidos por meio de sucessivas passagens intraperitoneais utilizando animais de três a cinco semanas de idade. Inóculos em torno de 1×10^6- 1×10^7 resultam na obtenção de parasitas já após 48 horas. Para tal, os animais são eutanasiados por asfixia em câmara de CO_2 e os parasitas recolhidos da cavidade peritoneal por meio de lavagens com solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,2, estéril. A fim de eliminar restos celulares e células peritoneais residentes, o lavado obtido pode ser centrifugado por cinco minutos a 200 x g. O sobrenadante obtido pode ser utilizado para uma nova passagem ou centrifugado novamente a 1.000 x g por dez minutos, e o sedimento, ressuspenso em meio de cultura, sem adição de SFB, para os ensaios de interação com as células hospedeiras.

Cultivo e Manutenção de Cultura de Células

As culturas de células são mantidas em frascos de poliestireno de 25 cm^2, 75 cm^2 ou 150 cm^2, dependendo da quantidade de células, contendo meio específico para cada linhagem e SFB. A cada 48 horas ou após a formação de monocamadas confluentes, as culturas são tratadas com um volume suficiente de solução contendo tripsina a 37ºC. Após o desprendimento das células, a tripsina é retirada e substituída por meio de cultura contendo SFB, para inativar o restante de tripsina presente. Jatos de meio no fundo do frasco são feitos para desprender as células, que devem ser centrifugadas para obtenção do sobrenadante. O sedimento obtido é ressuspenso em meio de cultura suplementado com SFB, e distribuído entre o frasco vigente e novos frascos de cultura. Para os experimentos de proliferação as células são semeadas em placas de cultura (24 ou 96 poços) e, quando a cultura se torna confluente, cada poço é infectado com taquizoítas. Ao término do tempo inicial de interação, SFB e meio com os compostos a serem testados são adicionados em cada poço, incluindo sempre em cada placa um controle positivo (células infectadas não tratadas). O tempo de interação e a relação parasita-célula são arbitrários e dependem do índice de infecção e do tempo de tratamento que se deseja analisar.

Avaliação da Atividade Antiproliferativa

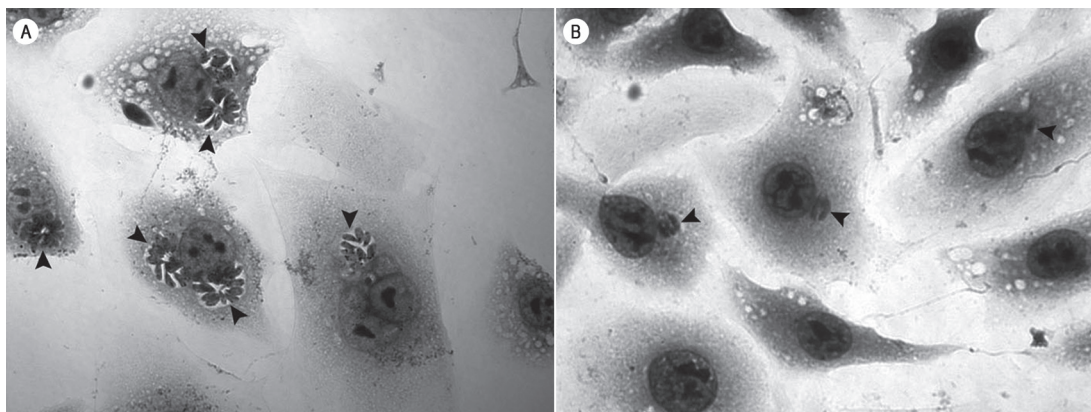
O cálculo da concentração necessária para inibir a proliferação parasitária em 50% (IC_{50}) pode ser feito por meio da análise das curvas obtidas nos experimentos de proliferação com diferentes concentrações. A porcentagem de proliferação é indicada em gráfico em função da concentração da droga mediante regressão não linear.

Microscopia Óptica

O método de microscopia óptica é bastante simples e consiste na observação das células infectadas em um microscópio óptico de campo claro ou de fluorescência (Figura 2). Para tal, após o término do tratamento da cultura infectada, as células aderidas a lamínulas, em placas de 24 poços, devem ser fixadas (usualmente com fixador de Bouin), coradas (por Giemsa ou *kit* de coloração) ou marcadas com anticorpo anti-*T. gondii* e montadas em lâminas (Martins-Duarte *et al.*, 2006; Saleh *et al.*, 2007). Essa metodologia permite avaliar de diferentes formas o efeito antiproliferativo. Com base na observação ao microscópio óptico, podem ser calculadas diversas variáveis – como o número de parasitas por vacúolo, o número total de parasitas, a porcentagem de células infectadas –, que são usadas para avaliar a atividade da droga e calcular a porcentagem de inibição. Outra forma de avaliar o efeito de

compostos na proliferação por microscopia óptica é o cálculo do índice de associação (Araújo-Jorge & Souza, 1984), por meio da seguinte fórmula: índice de associação = porcentagem de células infectadas x número total de parasitas intracelulares/número total de células.

O número de células observadas deve ser suficiente para uma avaliação confiável e reprodutível, levando em conta que em média são avaliadas pelo menos duzentas a quatrocentas células em diferentes lamínulas (Melo, Mayerhoffer & Souza, 2000; Martins-Duarte *et al.*, 2006).

Figura 2 – Imagens de células LLC-MK2 infectadas com taquizoítas da cepa RH de *Toxoplasma gondii* coradas com *kit* pan-óptico

A – Células infectadas não tratadas. B – Células infectadas tratadas por 24 horas com uma combinação de sulfadiazina e pirimetamina, mostrando a redução no número de taquizoítas por vacúolo parasitóforo.

Essa metodologia, além de gerar resultados bastante reprodutíveis, é de baixo custo, porém é a mais limitada quando é necessário avaliar um grande número de compostos, em virtude do longo tempo necessário para o exame de cada lamínula.

Ensaio Imunoabsorvente Ligado a Enzima (Elisa)

Este método avalia a proliferação parasitária diretamente em placas de 96 poços (Derouin & Chastang, 1988) utilizando imunoglobulina G anti-*T. gondii* (anticorpo primário) e imunoglobulina G conjugada a fosfatase alcalina (anticorpo secundário). Após o tratamento, as culturas infectadas são fixadas e tratadas com tampão de bloqueio para diminuir as ligações inespecíficas. Cada poço, então, é incubado com anticorpos anti-*T. gondii* obtidos, geralmente, a partir do soro de coelhos imunizados e, após determinado tempo, os poços são lavados e incubados com imunoglobulina G anticoelho conjugada à fosfatase alcalina. Como substrato para a fosfatase alcalina, é utilizado paranitrofenil fosfato. A reação é um produto corado e o resultado é obtido por meio de leitura da densidade óptica (DO) por espectrofotometria em leitor de placas (A = 405 nm). A relação entre os valores de DO entre o controle e as células tratadas com diferentes concentrações de cada droga é utilizada na avaliação da proliferação de *T. gondii*. Neste ensaio deve ser incluído também um controle negativo (células não infectadas) para servir de branco para as leituras.

Os resultados obtidos por esta metodologia são correlacionáveis com aqueles em que se emprega a microscopia óptica. Apresenta a vantagem de proporcionar a avaliação de uma quantidade maior de drogas de forma mais rápida, utilizando reagentes simples e um espectrofotômetro com leitor de placas.

Incorporação de [5,6-^{3}H] uracila

Esta técnica se baseia na descoberta de que *T. gondii* é capaz de utilizar uracila do meio extracelular e incorporar-se em seus ácidos nucleicos. Esta incorporação é altamente específica para o parasita, porque a célula hospedeira não possui a enzima uracil fosforribosiltransferase necessária para incorporar este nucleosídeo (Pffeferkorn, 1978).

A avaliação da proliferação parasitária por esta técnica pode ser feita tanto em placas de 24 poços como de 96 poços (micrométodo, Mack & McLeod, 1984). A [^{3}H] uracila é adicionada ao meio de cada poço, geralmente nas horas finais do tratamento. Ao fim do ensaio, o sobrenadante é descartado e a incorporação de uracila é determinada mediante a contagem de radioatividade do precipitado obtido das culturas infectadas e tratadas. A marcação com a uracila radioativa é uma função linear do número de parasitas presentes, sendo então bastante exata para a avaliação da proliferação de *T. gondii* (Mellors, Debs & Ryan,1989).

No entanto, a metodologia da incorporação de [^{3}H] uracila acarreta algumas dificuldades, uma vez que é necessário um laboratório equipado e com licença para utilizar marcadores radioativos e de treinamento especializado para trabalhar com materiais radioativos. Além disso, várias etapas e reagentes são requeridos até a obtenção do resultado final, o que eleva um pouco os custos com o experimento, além de gerar rejeitos radioativos.

Beta-galactosidase

Taquizoítas transfectados com o gene da enzima beta-galactosidase também são utilizados para quantificar a taxa de proliferação de *T. gondii* com acurácia. A beta-galactosidase é uma enzima hidrolase que catalisa a hidrólise de beta-galactosídeos em monossacarídeos. A proliferação parasitária é proporcional à atividade da beta-galactosidase (Mcfadden, Seeber & Boothroyd, 1997). Para tal, culturas de células em placas de 96 poços são infectadas com parasitas expressando beta-galactosidase de forma constitutiva. Neste ensaio deve ser utilizado meio de cultura sem a presença do indicador vermelho de fenol, pois o resultado da atividade da beta-galactosidase é dependente da geração e detecção de um derivado do vermelho de fenol, e a presença do indicador no meio interferirá na leitura do resultado. Para avaliar a atividade antiproliferativa dos inibidores após o tratamento, o composto galactopiranosídeo vermelho-β-D-clorofenol (CPRG) (substrato da beta-galactosidase) é adicionado ao meio de cada poço e incubado por alguns minutos ou horas. A catálise do substrato pela beta-galactosidase gera um produto com cor, e a absorbância de cada poço é determinada pela leitura espectrofotométrica a 570 nm e 630 nm com um leitor de placas.

O ensaio da beta-galactosidase requer a adição de um único indicador. É bastante simples e de custo acessível. Uma vez que o CPRG é um análogo estrutural do vermelho de fenol, componente comum dos meios de cultura e atóxico (Seeber & Boothroyd, 1996), permite a obtenção de parasitas ainda viáveis para outros tipos de avaliação, se desejado.

Cepas que Expressam Proteína Fluorescente

Esta metodologia avalia a proliferação de *T. gondii* por meio do uso de cepas transfectadas com genes de proteínas fluorescentes. O método desenvolvido por Gubbels, Li e Striepen (2003) faz uso de uma linhagem de parasitas altamente fluorescentes transfectados de forma estável com uma proteína fluorescente amarela (YFP), uma versão da GFP (proteína fluorescente verde). Nesta metodologia, culturas de células são semeadas em placas pretas de 96 ou 386 poços com o fundo transparente e são infectadas com os taquizoítas que expressam YFP. A proliferação parasitária é avaliada pela emissão de fluorescência em cada poço utilizando um leitor de placas. A relação entre o crescimento parasitário e a intensidade de fluorescência mostrou ser linear, e os resultados obtidos por esta metodologia correlacionam-se com os obtidos pelo método da beta-galactosidase. A leitura é feita a partir do fundo,

com as placas devidamente tampadas para manter o ambiente estéril, permitindo que uma mesma placa seja utilizada para diferentes horas de tratamento. Para este experimento, o meio de cultura também não deve conter o indicador vermelho de fenol, para que não haja interferência na emissão de fluorescência. Além do controle positivo, também deve ser feito um negativo (células não infectadas), para servir de branco. Esta metodologia possui a vantagem de não requerer etapas adicionais para a obtenção do resultado e um único experimento pode ser utilizado para a verificação de diferentes tempos de tratamento. Permite avaliar de forma rápida uma maior quantidade de compostos.

Outra metodologia, também descrita, emprega taquizoítas de *T. gondii* transfectados com uma GFP. O efeito antiproliferativo é analisado por citometria de fluxo, permitindo a avaliação simultânea da atividade antiparasitária e da toxicidade dos compostos à célula hospedeira (Shubar *et al.*, 2008). As culturas de células em placas de 24 poços são infectadas com os parasitas-GFP. Ao término do tratamento, as células aderidas são removidas e fixadas para a análise em citômetro de fluxo. A eficácia das drogas é determinada pelo cálculo da porcentagem relativa de células infectadas, determinado pela expressão de GFP comparada com as células de controle infectadas (não tratadas). A toxicidade é determinada pela comparação do número total de células viáveis (células aderidas) entre os poços tratados com o controle. A viabilidade também é mensurada por citometria de fluxo.

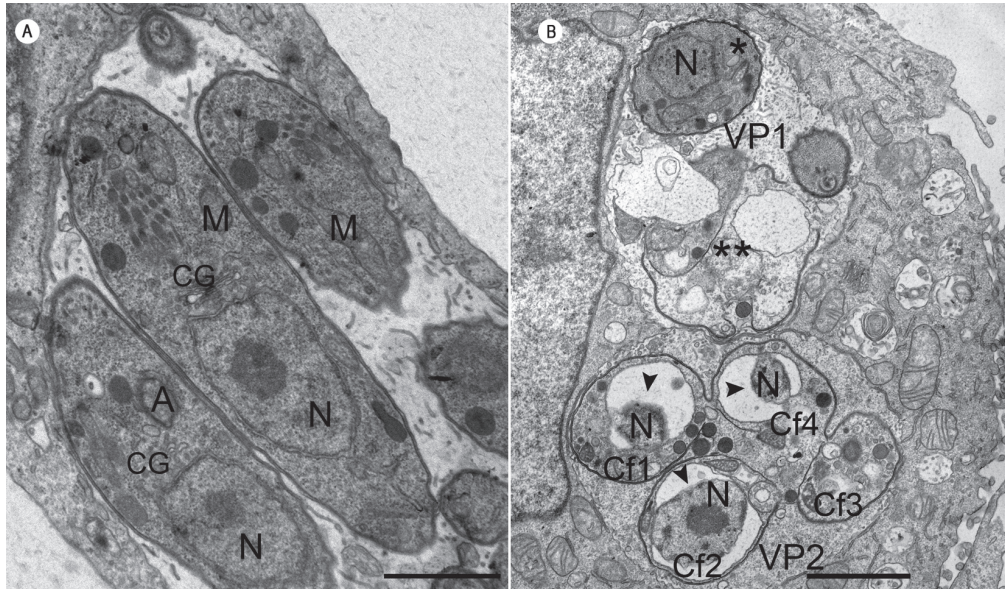
Citotoxicidade para a Célula Hospedeira

É de extrema importância avaliar, além do efeito antiproliferativo em *T. gondii*, a toxicidade dos compostos em células de mamíferos, como forma de selecionar aqueles mais ativos e seletivos. Neste ensaio, as células hospedeiras também são tratadas com diferentes concentrações dos compostos, para determinar a dose tóxica de 50% (TD_{50}) por meio da análise das curvas de dose-resposta. Com os valores de IC_{50} e TD_{50} é possível calcular o índice terapêutico (IT): $IT = TD_{50}/IC_{50}$. Quanto maior for o valor de IT obtido, menos tóxico ao hospedeiro e mais seletivo ao parasita é o composto.

Para a obtenção de TD_{50} podem ser empregadas diferentes metodologias, entre as quais se destacam o teste de exclusão com corantes vitais, como azul de Tripan ou iodeto de propídeo; o método radioativo com incorporação de [^{3}H] timidina; a análise de potencial mitocondrial ativo com marcadores fluorescentes como rodamina 12. Os métodos colorimétricos (MTT, MTS, XTT) utilizam sais de tetrazólio que são convertidos em formazam pelas enzimas desidrogenases mitocondriais em células viáveis e metabolicamente ativas.

Análise dos Efeitos Ultraestruturais por Microscopia Eletrônica

Por ser *T. gondii* um protozoário de dimensões microscópicas, o uso da microscopia eletrônica de transmissão é uma ferramenta bastante útil para avaliar alterações na estrutura celular ocasionada pelo tratamento com diferentes compostos (Figura 3). Por meio da análise de cortes ultrafinos (cerca de 60 nm de espessura), é possível localizar possíveis alvos celulares dos compostos.

Figura 3 – Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão de cortes ultrafinos de células LLC-MK2 infectadas com taquizoítas de *Toxoplasma gondii*

A – Controle: taquizoítas com morfologia e estruturas características. B – Células infectadas tratadas com itraconazol por 24 horas. No vacúolo parasitóforo 1 (VP1) observa-se um parasita lisado (**) e outro inalterado (*). VP2 apresenta taquizoíta com processo de divisão interrompido, caracterizado pela presença de quatro células-filhas (Cf). Em três Cfs pode-se visualizar também o descolamento do envoltório nuclear (cabeça de seta). N= núcleo; M= mitocôndria; A= apicoplasto; CG= complexo de Golgi. Barra de 1 μm.

AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE COMPOSTOS

Os estudos *in vivo* são importantes para avaliar o potencial quimioterápico dos compostos selecionados nos ensaios *in vitro* em um modelo experimental da doença.

Animais

Como forma de avaliar o efeito *in vivo* de compostos em *T. gondii*, o modelo murino é o mais utilizado. Os camundongos (*Mus musculus*) são animais bastante suscetíveis à infecção por *T. gondii*, sucumbindo à morte em poucos dias, de acordo com a virulência da cepa inoculada. Por isso mesmo são utilizados para avaliar o efeito de compostos em três diferentes tipos de manifestação da toxoplasmose: as fases aguda, crônica e reativada. Em razão de seu pequeno porte e fácil manipulação, requerem pequenas quantidades dos compostos para administração, e também são de fácil alojamento. A linhagem 'suíço', não isogênica, é a mais utilizada, mas outras linhagens isogênicas como BALB/c e C57BL/6 também podem ser utilizadas. As linhagens não isogênicas são muito importantes para o estudo *in vivo* de compostos, pois refletem com mais acurácia a variação observada normalmente em uma população heterogênea de indivíduos, que apresentam grande variabilidade na genética da suscetibilidade a infecções, e também a diferentes tratamentos.

O gênero dos animais também influencia o curso da infecção. As fêmeas são geralmente escolhidas para os experimentos *in vivo*, pois são mais suscetíveis a infecções do que os machos, apresentando maior índice de mortalidade. A diferença hormonal entre os gêneros tem sido sugerida como um dos fatores determinantes para esta discrepância significativa. Gênero e hormônios sexuais são conhecidos por influenciar a natureza da resposta imune (Roberts, Walker & Alexander, 2001). Camundongos fêmeas apresentam lesões inflamatórias mais intensas, que se

apresentaram reduzidas nas fêmeas tratadas com testosterona. Por outro lado, machos infectados, quando tratados com estrogênio, apresentaram maior mortalidade.

Para a avaliação *in vivo* do efeito do tratamento na transmissão vertical durante a gravidez, os camundongos da linhagem BALB/c são os mais utilizados; no entanto, o roedor *Calomys callosus* também mostrou ser um bom modelo experimental para o estudo da infecção congênita da toxoplasmose (Ferro *et al.*, 2002).

Cepas de *T. gondii*

A cepa RH costuma ser bastante utilizada nos ensaios da fase aguda da doença, mas, por ser mantida como taquizoíta por muitos anos (cerca de setenta anos) em laboratório, perdeu diversas características, como a capacidade de induzir a produção de oocistos em gatos, assim como sofreu uma redução na capacidade de formação de cistos tissulares (Dubey *et al.*, 1999). No entanto, outras cepas menos virulentas (ME49, VEG, EGS, C56 e Beverley) também são utilizadas para os ensaios com a fase aguda da doença. Já para avaliar a fase crônica, reativada ou congênita, a cepa ME49 é bastante utilizada, pois reproduz em camundongos uma forma mais atenuada da infecção, levando à formação de grande quantidade de cistos cerebrais nesses animais.

Modelo de Camundongo Infectado de Forma Aguda

Fase Aguda com RH

Camundongos são inoculados por via intraperitoneal com uma carga parasitária entre 10^2 e 10^5 taquizoítas. O tratamento geralmente tem início 24 horas pós-infecção e dura de sete a 14 dias (Quadro 1). Após o término do tratamento, a sobrevivência dos camundongos é avaliada por um período de trinta a noventa dias. Como a cepa RH é extremamente letal, a taxa de sobrevivência e o período pós-tratamento são parâmetros para avaliar o efeito de drogas. Ao término do tempo de observação, a presença de parasitas nos camundongos sobreviventes pode ser avaliada por diferentes métodos, que serão expostos mais adiante.

Quadro 1 – Trabalhos com modelo agudo *in vivo* de cepas virulentas em camundongos

	Camundongos			Taquizoíta			Tratamento		
	Linhagem	Idade/peso	Sexo	Cepa	Inóculo	Via	Início (t.p.i.)[a]	Duração (dias)	Via
Eyles & Coleman, 1952	NIH	20 g	–	Isolada no laboratório	2 x 10^4	i.p.	0 hora	14	Oral[b]
Araújo & Remington, 1974	Suíço (Webster)	–	–	RH	10^5	i.p.	0 hora	14	Oral[b]
Allegra *et al.*, 1987	BALB/c	20 g	Fêmea	RH	5 x 10^4	i.p.	24 horas	14	Oral[c] ou i.p.
Araujo *et al.*, 1996	Suíço (Webster)	20 g	Fêmea	RH	2,5 x 10^3	i.p.	24 horas	10	Oral[c]
Vukovic *et al.*, 1997	Suíço (Webster)	18-20 g	Fêmea	RH	10^2-10^6	i.p.	48 horas	21	Oral[b]
Nikolic *et al.*, 1999	Suíço (Webster)	5-6 semanas	Fêmea	RH	10^2	i.p.	0 hora	7-21 dias	Oral[b]

Quadro 1 – Trabalhos com modelo agudo *in vivo* de cepas virulentas em camundongos (continuação)

	Camundongos			Taquizoíta			Tratamento		
	Linhagem	Idade/peso	Sexo	Cepa	Inóculo	Via	Início (t.p.i.)[a]	Duração (dias)	Via
Djurkovic-Djakovic *et al.*, 1999	Suíço (Webster)	18-20 g	Fêmea	RH	10^2-10^4	i.p.	24 horas	14	Oral[b]
Dumas, Pizzolato & Pechère, 1999	Suíço (Webster)	–	–	RH	10^3	i.p.	24 horas	13	Oral[d]
Moshkani & Dalimi, 2000	Sorrier (*outbred*)	19-23 g	Fêmea	RH	10^4	i.p.	24 horas	10	Oral[c]
Khan *et al.*, 2001	Suíço	20-22 g	Fêmeas	RH	2 x 10^3	i.p.	24 horas	10	Oral[c]
Buitrago-Rey *et al.*, 2002	Suíço (ICR)	16-17 g	–	RH	2,5 x 10^3	i.p.	24 horas	7	Oral[c] ou i.p.
Degerli *et al*., 2003	BALB/c	25-30 g	Macho	Isolada na Turquia	10^3	i.p.	0, 12 ou 24 horas	10	Oral[c]
Mitchell *et al.*, 2004	CD-1	–	Fêmea	RH	10^3	Subcutânea	72 horas	10	Oral[c]
Grujic *et al.*, 2005	Suíço (Webster)	18-20 g	Fêmea	RH	10^2	i.p.	24 horas	7	Oral[b]
Mui *et al.*, 2005	Suíço (Webster)	30 g	Fêmea	RH	10^4	i.p.	1 hora	4	Oral[c]
Ferreira *et al.*, 2006	Suíço	–	Fêmea	RH	10^3	i.p.	24 horas	10	i.p.
Oliveira *et al.*, 2009	C57BL/6	8-12 semanas	Fêmea	RH	10^2	i.p.	–	–	subcutânea

[a] Tempo pós-infeção. [b]Droga adicionada à ração. [c]Gavagem. [d]Droga adicionada à água de beber. i.p., via intraperitoneal.

Fase Aguda com Cepas Cistogênicas

Camundongos são infectados por via oral com cistos obtidos a partir do cérebro de camundongos previamente infectados. A quantidade de cistos usada como inóculo deve ser suficiente para produzir mortalidade nos camundongos infectados. Djurkovic-Djakovic e Milenkovic (2001) mostraram que a infecção oral com vinte cistos de ME49 é capaz de produzir uma infecção aguda consistente levando à morte parte da população de camundongos infectados. Ferreira e colaboradores (2006) demonstraram que a cepa brasileira EGS também pode ser utilizada para a avaliação *in vivo* da fase aguda em camundongos (Quadro 2). A porcentagem de camundongos vivos ao término do tratamento, comparada ao controle, e o número de cistos cerebrais presentes nos animais podem ser utilizados como parâmetros para avaliar o efeito do composto utilizando cepas cistogênicas.

Quadro 2 – Trabalhos com modelo agudo *in vivo* de cepas cistogênicas em camundongos

	Camundongos			Cepa	Inóculo	Via	Tratamento		
	Linhagem	Idade/peso	Sexo				Início	Duração (dias)	Via
Araujo & Remington, 1974	Suíço (Webster)	22-24 g	–	C56	10^5 taquizoítas	i.p.	0 hora p.i.[a]	10	Oral[b]
Araújo *et al.*, 1996	Suíço (Webster)	20 g	Fêmea	C56	10 cistos	Oral	3 dias p.i.	10 dias	Oral[c]
Dumas, Pizzolato & Pechère, 1999	C57BL/6J	–	–	PRU	10 cistos	i.p.	5 dias p.i.	15	Oral[d]
Djurkovic-Djakovic *et al.*, 2002	Suíço (Webster)	18-22 g	Fêmea	Me49	20 cistos	Oral	4 dias p.i.	14	Oral[b]
Yardley *et al.*, 2002	Suíço (Webster)	20 g	Fêmea	C56	10 cistos	Oral	3 dias p.i.	10	i.p.
Grujic *et al.*, 2005	Suíço (Webster)	18-20 g	Fêmea	Me49	10 ou 20 cistos	Oral	4 dias p.i.	21 ou 28 dias	Oral[b]
Ling *et al.*, 2007	Suíço (Webster)	–	Fêmea	C56	5 cistos	Oral	3 dias p.i.	10 dias	i.p.
Rajapakse *et al.*, 2005	BALB/c	–	Fêmea	Me49	20 cistos	i.p.	3 dias a.i.[e]	13 dias	i.p. (a cada 2 dias)
Ferreira *et al.*, 2006	Suíço	–	Fêmea	EGS	10 cistos	Oral	48 horas p.i.	10	i.p.
Oliveira *et al.*, 2009	C57BL/6	8-12 semanas	Fêmea	Me49	20 cistos	i.p.	–	–	subcutânea
Martins-Duarte *et al.*, 2010	Suíço (CF1)	18-22 g	Fêmea	Me49	20 cistos	i.p.	4 dias p.i.	10	Oral[c] e i.p.

[a] Tempo pós-infecção. [b]Droga adicionada à ração. [c]Gavagem. [d]Droga adicionada à água de beber. [e]Antes da infecção. i.p., via intraperitoneal.

Fase Crônica

Para a avaliação da fase crônica, camundongos são inoculados com uma quantidade não letal de parasitas de uma cepa avirulenta para estes animais. Após trinta dias de infecção, a presença de cistos cerebrais já pode ser visualizada, porém a infecção crônica estável é alcançada quando não mais se observa mortalidade entre animais infectados. Antes do início do tratamento, recomenda-se o exame para detecção de cistos no cérebro de um camundongo para confirmar a infecção, já que o tratamento deve ser iniciado após comprovação da presença de cistos. O tratamento dos animais cronicamente infectados pode ser feito durante o período de duas a oito semanas, ao término do qual é feita a quantificação do número de cistos cerebrais ou DNA parasitário.

Fase Reativada

No modelo de fase reativada, animais com infecção crônica estabelecida são induzidos a um estado de imunossupressão com o uso de corticoides (Djurkovic-Djakovic & Milenkovic, 2001), ou empregam-se camundongos deficientes em resposta imune como os camundongos nocaute para o fator regulatório de interferon 8 (ICSBP/IRF-$8^{-/-}$) ou com imunodeficiência combinada severa (SCID). Os animais ICSBP/IRF-$8^{-/-}$ e SCID, após serem infectados, devem ser tratados com sulfadiazina para conter a infecção e permitir a cronificação da doença (Dunay *et al.*, 2004).

Essa metodologia mimetiza os sintomas de toxoplasmose encefálica – já que o sistema nervoso central é o maior sítio de cistos latentes em camundongos –, sendo bastante comum que se manifeste em indivíduos imunossuprimidos. A administração dos imunossupressores ou a interrupção do tratamento com sulfadiazina leva à reativação da doença. O tratamento é iniciado logo após esse período, e a sobrevivência é acompanhada ao longo do tratamento. O número de cistos cerebrais também pode ser examinado nos camundongos sobreviventes.

Modelo de Toxoplasmose Congênita

Neste modelo, fêmeas virgens de *Calomys callosus* soronegativas para *T. gondii* são postas para acasalar. Os animais somente serão infectados durante o período gestacional. Considera-se o dia 1 de gestação aquele em que se pode verificar a presença de esperma no exsudato vaginal da fêmea. Após confirmação da gestação, as fêmeas são separadas dos machos. Para este modelo a cepa Me49 também é a mais utilizada, pois a infecção resultante não deve ser letal. Após a infecção da fêmea, deve ser feito um exame sorológico comprovando sua soroconversão como um indicativo de infecção. A análise da transmissão vertical após o tratamento pode ser feita por meio do exame dos tecidos de fetos ou neonatos para a presença de parasitas (Ferro *et al.*, 2002).

Contagem de Cistos Cerebrais

Findo o tempo de observação pós-tratamento, os animais são eutanasiados para o exame de cistos cerebrais. Inicialmente, o cérebro do camundongo é retirado, lavado em solução salina a 4°C para remoção de coágulos sanguíneos, fragmentado com uma tesoura e macerado em solução salina estéril através de sucessivas passagens em agulhas de diferentes calibres. A enumeração de cistos é feita com base na análise de um mínimo de três alíquotas da suspensão de cérebro ao microscópio óptico. Para tal, uma pequena alíquota da suspensão é colocada em uma lâmina e coberta com uma lamínula. Faz-se então o exame de toda a sua área no microscópio. A quantificação do número total de cistos por cérebro é obtida por meio de uma regra de três entre o número de cistos obtidos no determinado volume utilizado para contagem e o volume total utilizado para macerar o cérebro.

O exame de cistos cerebrais é de grande valia para verificar a eficácia de um tratamento com cepas cistogênicas na fase aguda e é parâmetro para verificar a eficiência do tratamento na fase crônica, na qual a presença de um menor número de cistos nos camundongos tratados em comparação aos camundongos não tratados indica atividade nessa fase da doença. A ausência de cistos cerebrais não é confirmatória da cura da doença, já que o parasita pode estar presente em outros órgãos ou pode haver cistos cerebrais em quantidade inferior ao limite de sensibilidade de detecção do teste.

Exame Histopatológico ou Imuno-histoquímico

Além da quantificação de cistos cerebrais, o cérebro e outros órgãos também podem ser examinados em cortes histológicos. Após a eutanásia dos animais, o cérebro e outros órgãos são retirados, fixados em formaldeído, desidratados e embebidos em parafina. Os cortes de tecidos obtidos são corados e/ou incubados com anticorpos anti-*T. gondii*. Esta metodologia permite a identificação de parasitas intracelulares e extracelulares e de cistos teciduais, assim como avalia a presença de inflamação ou destruição tecidual induzidas pelo parasita.

Bioensaio

Este ensaio destina-se a indicar a presença de infecção residual nos camundongos sobreviventes após o tratamento utilizando homogenatos de diversos órgãos, como cérebro, fígado, coração e pulmão. Camundongos recém-nascidos

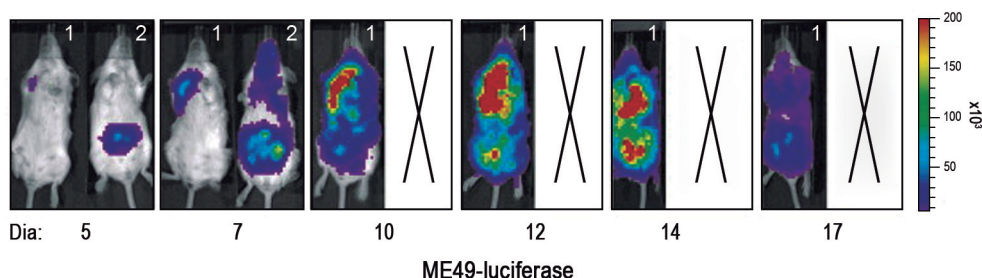
são inoculados por via oral ou intraperitoneal com o homogenato. A sobrevivência do animal e a ausência de parasitas na cavidade peritoneal ou de anticorpos anti-*T. gondii* (verificado por meio de testes sorológicos) nos camundongos inoculados com a suspensão de órgãos pode ser interpretada como a cura ou ausência de parasitas viáveis nos tecidos dos camundongos tratados.

Método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Esta técnica é bastante sensível em relação aos outros métodos, pois permite detectar e quantificar a presença de infecção mesmo em amostras de tecidos pouco parasitadas. A PCR em tempo real, diferente da convencional, é mais rápida e sensível e diminui os falsos positivos. Esta metodologia pode ser útil para verificar a presença de infecção residual e comprovar a cura nos camundongos sobreviventes após o tratamento.

Bioluminescência

Esta técnica permite o mapeamento em tempo real da progressão espacial e temporal da infecção em um mesmo animal, e facilita o acompanhamento da infecção ao longo dos dias de tratamento. Para utilização desta técnica é necessário uma população clonal de *T. gondii* transgênico, expressando de forma estável o gene da enzima luciferase. Saeij, Boyle e Grigg (2005), utilizando uma cepa de *T. gondii* que expressa o gene da luciferase, mostraram a reativação de cistos por uso de bioluminescência. A imagem de bioluminescência é formada pela luz produzida pela reação da enzima luciferase e seu substrato (luciferina). Os tecidos de mamíferos não produzem luciferina ou qualquer outro substrato para a luciferase, logo esta molécula deve ser administrada para o imageamento. Após a injeção por via intraperitoneal, a luciferina se distribui rapidamente no organismo do camundongo e é capaz de penetrar a barreira hematoencefálica, permitindo a visualização de cistos cerebrais (Figura 4). Se a expressão da luciferase for estável, o número de parasitas presentes se correlaciona com a leitura de bioluminescência. A bioluminescência pode ser mensurada pela análise computacional dos fótons emitidos, permitindo a quantificação dos dados obtidos.

Figura 4 – Camundongos infectados por via oral com cistos de Me49 expressando o gene da luciferase

Obs: A distribuição pelos diferentes compartimentos do camundongo e a carga parasitária puderam ser acompanhadas ao longo dos dias.

Fonte: Adaptado de Boyle, Saeij & Boothroyd, 2007.

Ao contrário das técnicas convencionais, a avaliação da bioluminescência não é invasiva, ou seja, não é necessário eutanasiar os animais, e com ela é possível detectar pequenas quantidades de patógenos. O método, porém, apresenta algumas limitações: a luz produzida sofre atenuação pelos tecidos vizinhos; a bioluminescência é diminuída pela pigmentação dos órgãos, como fígado e baço, entre outros; camundongos pretos, como o C57BL/6, absorvem a luz emitida, sendo necessário remover os pelos com um creme depilatório de modo que se minimize este problema; e há dificuldade em separar fótons produzidos por células infectadas em sítios adjacentes. Os valores de bioluminescência

absolutos produzidos por um número de patógenos definido diferem nas diversas regiões anatômicas por causa da absorção e espalhamento da luz pelos tecidos sobrepostos (Hutchens & Luker, 2007).

ESTRATÉGIAS PARA DESCOBERTA DE NOVOS TRATAMENTOS ANTI-*T. GONDII*

O estudo de compostos com atividade anti-*T. gondii* em potencial é essencial para a descoberta de moléculas líderes para o desenvolvimento de uma futura terapia da toxoplasmose. A escolha do alvo quimioterápico e da classe de compostos para dar início ao estudo *in vitro* pode basear-se em diferentes estratégias, usadas ao longo de vários anos, na descoberta de tratamentos de diversas doenças.

Avaliação de Fármacos Usados em Tratamentos para Outras Doenças Causadas por Patógenos em Humanos

Esta estratégia baseia-se em ampliar o leque de aplicações das drogas indicadas para o tratamento de doenças provocadas por outros patógenos em humanos. Foi a primeira a ser usada na descoberta de um tratamento para a toxoplasmose. No período das décadas de 1940 e 1950, testes com diversos compostos com atividade antibacteriana e antifúngica, assim como a maioria dos compostos antimaláricos, não obtiveram êxito em modelos de infecção com *T. gondii*. As únicas exceções foram as sulfonamidas (sulfadiazina) e as 2:4-diaminopirimidinas (pirimetamina) (Eyles,1953).

Na década de 1970 demonstrou-se em modelos murinos a atividade do antibiótico clindamicina, introduzido poucos anos depois no tratamento da infecção ocular e da toxoplasmose encefálica, antes mesmo que o seu mecanismo de ação em *T. gondii* fosse conhecido (Araujo & Remington, 1974).

Avaliação de Compostos ou Fármacos Originalmente Desenvolvidos para Outras Indicações, cujo Alvo Esteja Presente em *T. gondii*

Exemplos específicos desta estratégia incluem a miltefosina e a eflornitina usadas para o tratamento da leishmaniose visceral e da doença do sono, respectivamente, e que foram originalmente desenvolvidas para o tratamento do câncer (Croft, Seifert & Yardley, 2006). Do mesmo modo, os bisfosfonatos, usados no tratamento da osteoporose, têm demonstrado efeito contra diversos protozoários, incluindo *T. gondii*.

A vantagem de estudar fármacos disponíveis no mercado para o tratamento de outras doenças reside no fato de tais medicamentos já terem sido aprovados para o uso em humanos e de possuírem toxicidade e farmacocinética conhecidas.

Avaliação de Compostos que Atuam em Vias Metabólicas Diferentes das Encontradas nos Hospedeiros

Vias metabólicas exclusivas dos patógenos, ou seja, diferentes daquelas presentes no hospedeiro mamífero, são alvos ideais. Compostos que interferem somente nas funções enzimáticas do parasita seriam provavelmente inócuos para o ser humano. Diversas vias e proteínas semelhantes àquelas encontradas em procariotos e plantas, porém ausentes no hospedeiro animal, já foram identificadas em *T. gondii*. A via do ácido chiquímico, componentes da cadeia respiratória mitocondrial e vias metabólicas do apicoplasto são alguns exemplos (Lin, Gross & Bohne, 2011; Wiesner *et al*, 2008).

Descoberta de Novos Compostos com Potencial Antiparasitário

De todas as estratégias, esta é a mais empírica, pois se baseia na identificação de novas entidades químicas com atividade antiparasitária em potencial. Diversos compostos novos surgem a partir de síntese química ou são isolados

de produtos naturais na expectativa de encontrar novas moléculas líderes para o tratamento de diversas doenças, entre as quais as provocadas por parasitas.

Combinação de Drogas

O estudo de novas combinações de drogas também é uma estratégia para alcançar novos tratamentos contra *T. gondii*. A terapia combinada é reconhecida como a mais eficaz para o tratamento da toxoplasmose. Quando administrados sozinhos, a pirimetamina e outros fármacos não são capazes de reduzir a carga parasitária de forma significativa (Katlama *et al*., 1996). Resultados obtidos mediante a combinação de compostos usados para o tratamento de outras doenças, ou compostos inéditos, ainda em avaliação *in vitro,* juntamente com os fármacos já em uso para o tratamento da toxoplasmose, podem levar a novas possibilidades terapêuticas.

Além disso, o uso de terapia combinada apresenta diversas vantagens em relação ao uso de uma única droga, pois pode atuar em diferentes alvos ou doenças simultaneamente, possibilitando a diminuição da dosagem administrada de cada uma das drogas, mas mantendo a atividade terapêutica com redução dos efeitos colaterais, além de prevenir o surgimento de resistência.

COMPOSTOS E ALVOS PROMISSORES

Entre os diferentes compostos ou vias estudadas atualmente, destacam-se os seguintes.

Inibidores da Biossíntese de Esteróis

São exemplos os análogos de azasteróis e azóis. Estes inibidores são excelentes exemplos de drogas testadas com sucesso contra outros patógenos e que apresentaram atividade anti-*T. gondii*. Embora o mecanismo de ação desses compostos ainda seja desconhecido em *T. gondii*, apresentam seletividade para este parasita, o que os credencia como compostos promissores para o tratamento da toxoplasmose.

Inibidores da Di-hidrofolato Redutase

A enzima di-hidrofolato redutase catalisa a redução do ácido fólico a ácido folínico. *T. gondii* é incapaz de obter o ácido folínico reduzido de forma exógena, e depende exclusivamente de sua síntese (Allegra *et al*., 1987). A pirimetamina, fármaco mais utilizado para o tratamento da toxoplasmose, atua na inibição dessa enzima.

Inibidores da Cadeia Transportadora de Elétrons Mitocondrial

As hidroxinaftoquinonas são inibidores do complexo bc_1 (complexo III). Entre estas, a atovaquona é utilizada como segunda escolha para o tratamento da toxoplasmose. Em estudos com novas hidroxinaftoquinonas, observou-se atividade promissora em *T. gondii* (Ferreira *et al.*, 2006). A NADH desidrogenase também é um alvo promissor. Em eucariotos essa classe de enzima está dividida em duas subfamílias: NADH desidrogenase do tipo I (complexo I) e NADH desidrogenase do tipo II (NADH2). As NADH2s foram descritas em plantas, protozoários e bactérias, mas estão ausentes no hospedeiro mamífero (Kerscher, Zickermann & Brandt, 2008). A suscetibilidade de *T. gondii* a inibidores dessa enzima já foi demonstrada (Saleh *et al.*, 2007).

Vias do Apicoplasto

O apicoplasto é uma organela de origem endossimbiótica secundária e possui diversas vias semelhantes àquelas encontradas em procariotos e ausentes na célula hospedeira. Entre as vias do apicoplasto mais estudadas, e cuja interferência demonstrou afetar a viabilidade de *T. gondii*, mencionem-se estas: biossíntese de ácidos graxos do tipo II, síntese de isoprenoides, síntese de RNA e proteínas e topoisomerase II (Wiesner *et al.*, 2008).

Inibidores de Microtúbulos

As dinitroanilinas são conhecidos inibidores de microtúbulos que se ligam de forma seletiva à alfatubulina ocasionando a desorganização dos microtúbulos. *T. gondii* tem demonstrado suscetibilidade a diversos derivados de dinitroanilinas. Esta classe de compostos foi descoberta inicialmente para uso como herbicida, mostrando mais tarde possuir atividade contra diversos protozoários. Não afetam vertebrados ou fungos, e atuam de forma seletiva nos microtúbulos dos protozoários (Ma *et al.*, 2010).

REFERÊNCIAS

ALLEGRA, C. J. *et al*. Potent *in vitro* and *in vivo* antitoxoplasma activity of the lipid-soluble antifolate trimetrexate. *The Journal of Clinical Investigation*, 79: 478-482, 1987.

ARAUJO, F. G. & REMINGTON, J. S. Effect of clindamycin on acute and chronic toxoplasmosis in mice. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 5: 647-651, 1974.

ARAUJO, F. G. *et al*. Rifapentine is active *in vitro* and *in vivo* against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 40: 1.335-1.337, 1996.

ARAUJO-JORGE, T. C. & SOUZA, W. Effect of carbohydrates, periodate and enzymes in the process of endocytosis of *Trypanosoma cruzi* by macrophages. *Acta Tropica*, 41: 17-28, 1984.

BOYLE J.P.; SAEIJ J. P. & BOOTHROYD J. C. *Toxoplasma gondii*: inconsistent dissemination patterns following oral infection in mice. *Experimental Parasitology*. 116(3):302-305, 2007.

BUITRAGO-REY, R. *et al*. Evaluation of two inhibitors of invasion: LY311727 [3-(3-acetamide-1-benzyl-2-ethyl-indolyl-5-oxy) propane phosphonic acid] and AEBSF [4-(2-aminoethyl)-benzenesulphonyl fluoride] in acute murine toxoplasmosis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49: 871-874, 2002.

CROFT, S.; SEIFERT, K. & YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *The Indian Journal of Medical Research*, 123: 399-410, 2006.

DEĞERLI, K. *et al*. Efficacy of azithromycin in a murine toxoplasmosis model, employing a *Toxoplasma gondii* strain from Turkey. *Acta Tropica*. 88: 45-50, 2003.

DEROUIN, F. & CHASTANG, C. Enzyme immunoassay to assess effect of antimicrobial agents on *Toxoplasma gondii* in tissue culture. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 32: 303-307, 1988.

DJURKOVIC-DJAKOVIC, O. & MILENKOVIC, V. Murine model of drug-induced reactivation of *Toxoplasma gondii*. *Acta Protozoologica*, 40: 99-106, 2001.

DJURKOVIC-DJAKOVIC, O. *et al*. Efficacy of atovaquone combined with clindamycin against murine infection with cystogenic (Me49) strain of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50: 981-987, 2002.

DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O. *et al*. Synergistic effect of clindamycin and atovaquone in acute murine toxoplasmosis. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 43: 2.240-2.244, 1999.

DUMAS, J. L.; PIZZOLATO, G. & PECHÈRE, J. C. Evaluation of trimethoprim and sulphamethoxazole as monotherapy or in combination in the management of toxoplasmosis in murine models. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 13: 35-39, 1999.

DUBEY, J. P. *et al*. Infection and immunity with the RH strain of *Toxoplasma gondii* in rats and mice. *The Journal of Parasitology*, 85: 657-662, 1999.

DUNAY, I. R. *et al*. Atovaquone maintenance therapy prevents reactivation of toxoplasmic encephalitis in a murine model of reactivated toxoplasmosis. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 48: 4.848-4.854, 2004.

EYLES, D. E. The present status of the chemotherapy of toxoplasmosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2: 429-444, 1953.

EYLES, D. E. & COLEMAN, N. Tests of 2,4-diaminopyrimidines on toxoplasmosis. *Public Health Reports*, 67: 249-252, 1952.

FERREIRA, R. A. *et al*. *Toxoplasma gondii*: *in vitro* and *in vivo* activities of the hydroxynaphthoquinone 2-hydroxy-3-(1'-propen-3-phenyl)-1,4-naphthoquinone alone or combined with sulfadiazine. *Experimental Parasitology*, 113: 125-129, 2006.

FERRO, E. A. *et al*. Effect of *Toxoplasma gondii* infection kinetics on trophoblast cell population in *Calomys callosus*, a model of congenital toxoplasmosis. *Infection and Immunity*, 70: 7.089-7.094, 2002.

GRUJIĆ, J. *et al*. Effectiveness of spiramycin in murine models of acute and chronic toxoplasmosis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25: 226-230, 2005.

GUBBELS, M. J.; LI, C. & STRIEPEN, B. High-throughput growth assay for *Toxoplasma gondii* using yellow fluorescent protein. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 47: 309-316, 2003.

HUTCHENS, M. & LUKER, G. D. Applications of bioluminescence imaging to the study of infectious diseases. *Cellular Microbiology*, 9: 2.315-2.322, 2007.

KATLAMA, C. *et al*. Pyrimethamine–clindamycin *vs*. pyrimethamine–sulfadiazine as acute and long-term therapy for toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *Clinical Infectious Disease*s, 22: 268-275, 1996.

KERSCHER, S.; ZICKERMANN, V. & BRANDT, U. The three families of respiratory NADH dehydrogenases. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 45: 185-222, 2008.

KHAN, A. A. *et al*. Activity of gatifloxacin alone or in combination with pyrimethamine or gamma interferon against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 45: 48-51, 2001.

LIN, S. S.; GROSS, U. & BOHNE, W. Two internal type II NADH dehydrogenases of *Toxoplasma gondii* are both required for optimal tachyzoite growth. *Molecular Microbiology*, 82: 209-221, 2011.

LING, Y. *et al*. The farnesyl-diphosphate/geranylgeranyl-diphosphate synthase of *Toxoplasma gondii* is a bifunctional enzyme and a molecular target of bisphosphonates. *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 30.804-30.816, 2007.

LUFT, G. J. *et al*. Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 329: 995-1000, 1993.

MA, C. *et al*. Dinitroaniline activity in *Toxoplasma gondii* expressing wild-type or mutant α-tubulin. *Antimicrob Agents Chemother*, 54: 1.453-1.460, 2010.

MACK, D. G. & MCLEOD, R. New micromethod to study the effect of antimicrobial agents on *Toxoplasma gondii*: comparison of sulfadoxine and sulfa azine individually and in combination with pyrimethamine and study of clindamycin, metronidazole, and cyclosporin A. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 26: 26-30, 1984

MARTINS-DUARTE, E. S. *et al*. Antiproliferative activities of two novel quinuclidine inhibitors against *Toxoplasma gondii* tachyzoites *in vitro*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58: 59-65, 2006.

MARTINS-DUARTE, E. S. *et al*. *Toxoplasma gondii*: fluconazole and itraconazole activity against toxoplasmosis in a murine model. *Experimental Parasitology*, 124: 466-469, 2010.

MCFADDEN, D. C.; SEEBER, F. & BOOTHROYD, J. C. Use of *Toxoplasma gondii* expressing beta-galactosidase for colorimetric assessment of drug activity *in vitro*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 41: 1.849-1.853, 1997.

MELLORS, J. W.; DEBS, R. J. & RYAN, J. L. Incorporation of recombinant interferon into liposomes enhances its ability to induce peritoneal macrophages antitoxoplasma activity. *Infection and Immunity*, 57: 132-137, 1989.

MELO, E. J. T.; MAYERHOFFER, R. O. & SOUZA, W. Hydroxyurea inhibits intracellular *Toxoplasma gondii* multiplication. *FEMS Microbiology Letters*, 185: 79-82, 2000.

MITCHELL, S. M. *et al*. Efficacy of ponazuril *in vitro* and in preventing and treating *Toxoplasma gondii* infections in mice. *The Journal of Parasitology*, 90: 639-642, 2004.

MOSHKANI, S. K. & DALIMI, A. Evaluation of the efficacy of atovaquone alone or in combination with azithromycin against acute murine toxoplasmosis. *Veterinary Research Communications*, 24: 169-177, 2000.

MUI, E. J. *et al*. Novel triazine JPC-2067-B inhibits *Toxoplasma gondii in vitro* and *in vivo*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2: 190, 2008.

NIKOLIĆ, T. *et al*. Treatment protocol determines the efficacy of clindamycin in acute murine toxoplasmosis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11: 145-149, 1999.

OLIVEIRA, T. C. *et al*. *Toxoplasma gondii*: effects of *Artemisia annua* L. on susceptibility to infection in experimental models *in vitro* and *in vivo*. *Experimental Parasitology*, 122: 233-241, 2009.

PFEFFERKORN, E. R. *Toxoplasma gondii*: the enzymic defect of mutant resistant to 5-fluorodeoxyuridine. *Experimental Parasitology*, 44: 26-35, 1978.

RAJAPAKSE, R. *et al*. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces splenocyte apoptosis and enhances BALB/c mice sensitivity to toxoplasmosis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 96: 179-185, 2005.

ROBERTS, C. W.; WALKER, W. & ALEXANDER, J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 476-488, 2001.

SABIN, A. B. Toxoplasmic encephalitis in children. *The Journal of the American Medical Association*, 116: 801-807, 1941.

SAEIJ, J. P.; BOYLE, J. P. & GRIGG, M. E. Bioluminescence imaging of *Toxoplasma gondii* infection in living mice reveals dramatic differences between strains. *Infection and Immunity*, 73: 695-702, 2005.

SALEH, A. *et al*. Growth inhibition of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* by nanomolar concentrations of 1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone, a high-affinity inhibitor of alternative (type II) NADH dehydrogenases. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 51: 1.217-1.222, 2007.

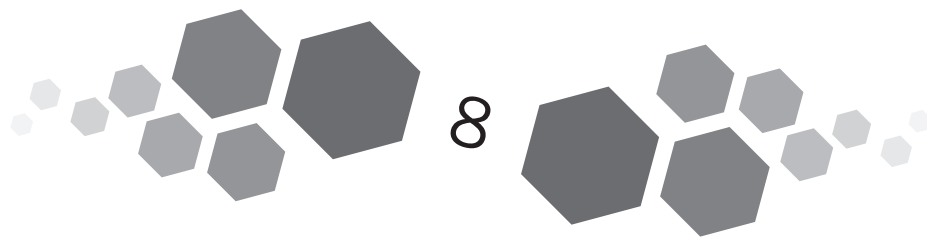
SEEBER, F. & BOOTHROYD, J. C. *Escherichia coli* beta-galactosidase as an *in vitro* and *in vivo* reporter enzyme and stable transfection marker in the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Gene*, 169: 39-45, 1996.

SHUBAR, H. M. *et al*. A new combined flow cytometry-based assay reveals excellent activity against *Toxoplasma gondii* and low toxicity of new bisphosphonates *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61: 1.110-1.119, 2008.

VUKOVIĆ, D. *et al*. Effect of clindamycin in a model of acute murine toxoplasmosis. *Clinical Microbiology and Infection*, 3: 89-94, 1997.

YARDLEY, V. *et al*. *In vivo* activities of farnesyl pyrophosphate synthase inhibitors against *Leishmania donovani* and *Toxoplasma gondii*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 46: 929-931, 2002.

WIESNER, J. *et al*. The plastid-like organelle of apicomplexan parasites as drug target. *Current Pharmaceutical Design*, 14: 855-871, 2008.

8

Epidemiologia da Toxoplasmose*

Jeffrey L. Jones • Jitender P. Dubey

A infecção por *Toxoplasma gondii* é muito prevalente em todo o mundo. Este capítulo discute os modos de transmissão da doença, a epidemiologia da infecção por *T. gondii* ao redor do mundo e no Brasil e os métodos de prevenção e controle.

TRANSMISSÃO POR CISTOS TECIDUAIS

Os cistos teciduais são uma parte essencial do ciclo de vida de *T. gondii*, são o estágio final do parasita, forma pela qual serão ingeridos pelos animais. Weinman e Chandler (1954) sugeriram inicialmente que os humanos poderiam ser infectados pela ingestão de carne malpassada, e Desmonts e colaboradores (1965) forneceram suporte em experimento com crianças em um sanatório de Paris, em que foi servida carne malpassada às crianças com a crença de que ajudaria a recuperação da tuberculose. Eles compararam as taxas de aquisição da infecção por *T. gondii* no sanatório e a taxa de aquisição de anticorpos contra *T. gondii* e observaram um aumento de 10% a 50% ao ano após a adição de duas porções de carne de cavalo malcozida à dieta diária, e de 100% ao ano após a adição de carne malcozida de costeletas de cordeiro. Como a prevalência de *T. gondii* é muito maior em ovelhas do que em cavalos ou gado, foi mostrada a importância do carnivorismo na transmissão do *T. gondii*. Foram diagnosticados 17 casos de toxoplasmose aguda sintomática em crianças que ingeriram carne de carneiro crua em uma festividade, entre as quais 16 (94,5%) apresentaram febre, dor de cabeça, mialgia, artralgia e adenopatia (cervical ou cervical/axilar). Um paciente apresentou quadro clínico de retinocoroidite. Todos os pacientes apresentavam anticorpos específicos da fase aguda da toxoplasmose (Bonametti *et al.*, 1997a). Uma paciente também relatou o fato de ter transmitido toxoplasmose ao filho recém-nascido (Bonametti *et al.*, 1997b). Nos Estados Unidos, Kenan, Kimball e Christenson (1969) descreveram a toxoplasmose em um grupo de estudantes de medicina que tinham ingerido hambúrgueres malpassados.

* Tradução: Heloisa Nascimento (chefe do Setor de Uveítes, Escola Paulista de Medicina/Unifesp)

Cistos teciduais viáveis foram encontrados em tecidos de animais naturalmente infectados, particularmente em porcos e ovelhas, e também no ambiente selvagem. Eles são extremamente raros em gado bovino. Descobriu-se que esses cistos teciduais permanecem durante meses nos tecidos comestíveis de animais vivos, e considerando o número de cistos em 50 g de amostras infectadas de um único animal comestível, o animal inteiro pode infectar muitas pessoas.

Existem diversos relatos sobre a toxoplasmose e o consumo de carne infectada, e algumas pesquisas sorológicas sugerem que a carne é mais importante do que os gatos como fonte de infecção humana (Dubey & Beattie, 1988). Como esperado, a prevalência da infecção de *T. gondii* é maior em trabalhadores de matadouro e em outros profissionais que manuseiam carne crua do que na população geral. Amoladores de facas de açougueiros podem ser contaminados por uma carcaça infectada ou por um pedaço de carne.

Levantamentos sorológicos e parasitológicos baseados em amostras de matadouros não fornecem uma avaliação verdadeira do risco para humanos porque o armazenamento e o tratamento pós-armazenamento da carne podem matar parte dos espécimes de *T. gondii* (Dubey *et al*., 2005). Alguns dos tratamentos com sais (rotulados como carne ''aprimorada'') matam os cistos teciduais de *T. gondii*. Além disso, a maior parte dos frangos vendidos a varejo é congelada, o que também mata o parasita. Nos Estados Unidos, um estudo de caso-controle descobriu que a carne malcozida é um fator de risco significativo para infecções recentes de *T. gondii*. Na Europa, a ingestão de carne cozida inapropriadamente (de cordeiro, bovina ou de caça) foi identificada como o principal risco (Bobić *et al*., 2007).

Felizmente, os cistos teciduais não são resistentes ao cozimento convencional (Dubey *et al.*, 1990) a 60ºC ou temperaturas mais altas. O cozimento no forno de micro-ondas é problemático. Por causa dos pontos quentes e frios, o cozimento no forno de micro-ondas não pode garantir a morte de *T. gondii* na carne (Lundén & Uggla, 1992). A salga, a defumação e a preparação de conservas, se forem feitas de modo apropriado, podem matar os cistos teciduais (Lundén & Uggla, 1992), mas estes procedimentos não são mundialmente padronizados. Os cistos de tecidos geralmente são destruídos pelo congelamento a -12ºC, e o armazenamento de carne em temperaturas mais altas não mata os cistos teciduais, pois eles sobrevivem ao armazenamento à temperatura de 4ºC a 6ºC por até dois meses (Jacobs, Remington & Melton, 1960).

TRANSMISSÃO POR TAQUIZOÍTAS

O taquizoíta é um organismo delicado incapaz de sobreviver fora do organismo de seu hospedeiro e é normalmente destruído por secreções gástricas. As formas pelas quais ele pode infectar são por transmissão placentária da mãe para o feto, por transfusão de leucócitos (transfusões de sangue comuns são virtualmente livres de risco) e acidentes laboratoriais. Taquizoítas em contato com a face podem penetrar a córnea e a mucosa bucal.

Embora *T. gondii* tenha sido encontrado no sêmen de machos de cabras e de ovelhas e do homem, praticamente não há risco de infecção venérea. Também foi encontrado na saliva, mas não existem evidências de sua difusão pelo beijo. A infecção por *T. gondii* pode ser transmitida por transplantes, e a infecção ativa pode surgir de duas maneiras: primeiro, do implante de órgãos ou de medula óssea de um doador infectado em um receptor não imune imunocomprometido; segundo, de um doador não infectado em um receptor imunocomprometido com infecção latente, que é ativada pelo próprio procedimento. Nesses casos, tanto os taquizoítas quanto os cistos teciduais podem estar envolvidos, apesar da maior probabilidade de envolvimento dos cistos. A terapia citotóxica e imunossupressora administrada ao receptor aumenta as chances de infecção ativa em ambas as circunstâncias.

T. gondii pode ser encontrado no leite (Dubey, 1980). Se presente, há um pequeno risco de transmissão relacionado ao leite de vaca. Esse risco, porém, é eliminado porque o leite de vaca geralmente é consumido depois de passar pela

pasteurização ou pela fervura. A toxoplasmose em humanos foi circunstancialmente relacionada à ingestão de leite de cabra não processado ou de leite humano (Bonametti *et al.*, 1997b). O leite de cabra é mais facilmente digerido por crianças do que o leite de vaca.

A prevalência de *T. gondii* em ovos de galinha é extremamente baixa e a ingestão de ovos malcozidos não é considerada um fator de risco importante para toxoplasmose (Dubey, 2009). Entretanto, os ovos devem ser completamente cozidos antes do consumo humano em razão dos riscos de infecção por outros patógenos.

A parasitemia durante a gravidez pode causar inflamação da placenta e disseminação de *T. gondii* para o feto. Em mamíferos complexos (humanos, ovelhas, cabras, porcos), a infecção congênita ocorre principalmente se a fêmea grávida se infecta durante a gravidez. Diferentemente do que acontece em humanos, infecções congênitas repetidas podem ocorrer em ratos ou *hamsters* e talvez em outros mamíferos pequenos. Ratos congenitamente infectados podem produzir ratos congenitamente infectados por dez ou mais gerações e podem não desenvolver anticorpos contra *T. gondii*, provavelmente por causa da tolerância imune (Dubey *et al.*, 1995). Embora as informações sobre as infecções congênitas nesses mamíferos pequenos geralmente não sejam mais relevantes do que as observadas em mamíferos maiores (como os humanos), questões biológicas específicas podem ser resolvidas nesses hospedeiros. Por exemplo, é intrigante o fato de que em ratos infectados por cepas virulentas e não virulentas somente a forma não virulenta tenha atravessado a placenta. A cepa do rato, o estágio do parasita e a forma de inoculação podem afetar a taxa de transmissão congênita.

EPIDEMIOLOGIA

A infecção por *T. gondii* em homens e em animais é muito disseminada ao redor do mundo, mas varia em diferentes áreas geográficas de um país. As causas para essa variação ainda não são conhecidas. Condições ambientais podem determinar o grau de disseminação natural de infecção por *T. gondii*. A infecção pode ser mais prevalente em climas quentes e em áreas de baixa altitude do que em climas frios e regiões de montanha, e também mais prevalente em áreas úmidas do que em áreas secas, mas esse quadro não é universal. Isso provavelmente é relacionado à esporulação e à sobrevivência de oocistos no ambiente.

Hábitos culturais e de higiene podem apresentar um papel importante na transmissão. Por exemplo, na França, a prevalência sorológica de *T. gondii* é relativamente alta. Isso se deve provavelmente aos hábitos de alimentação e cozimento. O hábito de comer carne crua ou malpassada está de alguma maneira relacionado a altos padrões de vida e é mais prevalente no mundo ocidental. A maioria dos asiáticos cozinha bem a carne que consome. Em países em desenvolvimento, o porco é geralmente bem cozido antes do consumo em virtude da presença de *Trichinella spiralis* e *Taenia solium*. Essas diferenças nos hábitos de cozimento podem ser em parte responsáveis pelas menores taxas de prevalência de infecções por *T. gondii* em algumas regiões da Ásia e África do que na Europa e América. As fontes de carne para infecção por *T. gondii* em humanos podem depender da infecção em animais de corte locais. Nos Estados Unidos, não se detectou infecção por *T. gondii* na carne bovina, e as carnes de cavalo não são frequentemente ingeridas por humanos. As aves são geralmente bem cozidas antes do consumo. A ingestão de cordeiro é provavelmente uma importante fonte de infecção por *T. gondii* em muitos países; entretanto, o consumo de carne de cordeiro nos Estados Unidos e em outros países é relativamente pequeno (Dubey *et al.*, 2005).

A proporção de infecção humana por *T. gondii* causada pela ingestão de carne crua ou malpassada contendo cistos teciduais e a porcentagem de casos decorrentes da presença de oocistos nas mãos ou em vegetais não lavados não são

conhecidas; mas é provável que em lugares onde há muitos gatos, mesmo os domésticos, como em partes da Costa Rica e do Brasil, os oocistos sejam a principal fonte, ao passo que em Paris, onde os gatos são mais bem controlados e onde se come muita carne crua ou malpassada, os cistos teciduais sejam a principal fonte. No futuro, pode ser que seja possível diferenciar os dois tipos de infecção sorológica, com base em métodos para detectar anticorpos de estágios específicos. Os estudos de avaliações de risco devem levar em conta que *T. gondii* pode ser transmitido de muitas maneiras e que os gatos estão presentes praticamente em toda parte, enquanto os resultados das avaliações podem variar de acordo com as questões formuladas. Bons exemplos de estudos de avaliação de risco são dados em Jones e colaboradores (2006). Entretanto, as pesquisas sorológicas que compararam a presença de infecção e o contato das pessoas com gatos forneceram resultados equivocados. Algumas encontraram uma associação, outras não. A razão disso pode estar nas questões elaboradas e na faixa etária pesquisada; o gato do vizinho pode disseminar *T. gondii* tanto quanto o gato do dono, portanto não é o contato com o gato que importa, mas sim o contato com o oocisto presente nas fezes do gato, que é um perigo universal. As fezes do felino geralmente são duras e podem permanecer confinadas a áreas de defecação por um longo tempo.

A extensão da infecção por *T. gondii* em gatos depende da disponibilidade de aves e pequenos animais infectados, que, por sua vez, se infectam por meio da ingestão de oocistos. Poder-se-ia esperar que a prevalência fosse maior em gatos de áreas rurais do que de áreas urbanas, e maior em gatos selvagens do que em gatos domésticos. Não existem dados sobre a importância relativa dos diferentes hospedeiros intermediários como fontes de infecção para gatos. Historicamente, os gatos são animais domésticos que auxiliam o combate a roedores. *T. gondii* pode lesionar o tecido neural de ratos e camundongos infectados, causando prejuízo no aprendizado e na memória e anormalidades comportamentais (Webster, 2001). Roedores infectados por *T. gondii* podem se tornar menos neofóbicos, levando a uma menor aversão ao odor de gatos. A hipótese de que *T. gondii* pode manipular o comportamento de seu hospedeiro para sua própria vantagem é fascinante (Lamberton, Donnelly & Webster, 2008). Esse comportamento pode ajudar a garantir que os roedores infectados por *T. gondii* sejam comidos pelos gatos e o que o ciclo de vida do parasita seja preservado.

Como dito anteriormente, os oocistos esporulados sobrevivem por longos períodos sob condições ambientais moderadas. Portanto, é plausível que frutas e vegetais crus provenientes de solo contaminado com *T. gondii* ingeridos possam causar infecção. Além disso, os humanos podem adquirir toxoplasmose por meio de cães domésticos que brincaram com fezes infectadas de gatos (Etheredge & Frenkel, 1995).

Brasil – Epidemiologia e Fatores de Risco

Uma revisão recente demonstrou o grande ônus da toxoplasmose clínica no Brasil (Dubey *et al.*, 2012). Investigações prévias no país descobriram aglomerados de doença em um seminário (Magaldi *et al.*, 1967), em grupos familiares de baixo poder socioeconômico, em estudantes de universidades (Magaldi *et al.*, 1969) e em pessoas que tomavam banho em uma lagoa (Tiribo *et al.*, 1970). Apesar de não fornecer provas definitivas de que a água de lagoa é uma fonte da infecção, este último estudo levantou a possibilidade de que as pessoas podem ser infectadas por *T. gondii* enquanto se banham ou nadam em águas contaminadas com oocistos, presumivelmente por engolirem água. A ingestão de água foi diversas vezes associada à infecção por *T. gondii* no Brasil (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003; Heukelbach *et al.*, 2007). Uma vez que *T. gondii* é resistente à inativação por cloro, uma filtração especial é necessária para tratar a água potável que pode estar contaminada com oocistos.

Diversos fatores de risco relacionados a alimentos, fezes de gato ou solo infectados foram descobertos em varias regiões do Brasil. Em um estudo que apresentou análises de uma única variável, Barbosa, Carvalho Xavier Holanda

e Andrade-Neto (2009) descobriram uma forte associação entre o contato com cães e gatos e a infecção pelo parasita. Gatos domésticos também foram associados à infecção por *T. gondii* em crianças no município de Jataizinho. Embora os gatos estejam associados à infecção nesses estudos, não se demonstrou que o contato com os animais seja um fator de risco associado a infecções recentes por *T. gondii* no município de Erechim (Jones *et al.*, 2007a). Conforme constatado anteriormente, o risco de infecções decorre da exposição das fezes de gato contaminadas com oocistos, que geralmente acontece somente por algumas semanas durante a vida. Em muitos casos, o maior risco de infecção por *T. gondii* para algumas pessoas origina-se de gatos da vizinhança ou de gatos selvagens que defecam em jardins ou em caixas de areia, ou perto de correntes de água. Outros fatores de risco para infecção por *T. gondii* em estudos brasileiros incluem a ingestão de carne malpassada e a ingestão de cordeiro congelado (o congelamento caseiro geralmente não é suficiente para matar *T. gondii*) (Jones *et al.*, 2007b; Avelino *et al.*, 2004). Um estudo prévio em Minas Gerais sugeriu que carne de porco pouco cozida ou vegetais contaminados com *T. gondii* do solo foram as fontes da infecção (Coutinho, 1982). Francisco e colaboradores descobriram uma associação entre o *Toxocara canis* (um helminto do solo) e a soropositividade para *T. gondii*, sugerindo um risco pós-natal relacionado ao solo (Francisco *et al.*, 2006). Nos seus estudos em Campos, Silva e colaboradores demonstraram altos níveis de contaminação ambiental pela alta soroprevalência (65%) em frangos criados livremente (Silva *et al.*, 2003), e Dubey e colaboradores descobriram que 39% dos frangos de quatro municípios do estado São Paulo foram naturalmente infectados com *T. gondii* (Dubey *et al.*, 2002). O solo e a água contaminados são a fonte de infecção mais provável dessas aves em ambos os estudos. Cavalcante e colaboradores (2006) descobriram que vegetais cultivados em hortas particulares (em adição a água tratada) constituíram um fator de risco nos seus estudos no estado de Rondônia, também sugerindo a água e o solo contaminados como fontes de infecção. Acredita-se que *T. gondii* exista em solo brasileiro há muitos anos (Coutinho, Lobo & Dutra, 1982).

SOROPREVALÊNCIA

A infecção por *T. gondii* é muito disseminada entre os humanos, e sua prevalência varia muito de local para local. A prevalência da infecção humana variou de um mínimo de 4% na Coreia para um máximo de 92% no Brasil. O teste sorológico e o ponto de corte usados são uma consideração importante em qualquer pesquisa. Por exemplo, os títulos *dye test* (DT) podem declinar a tal ponto que os anticorpos são detectáveis somente no soro não diluído. A infecção é frequentemente mais comum em climas quentes e em áreas de baixa altitude do que em climas frios e regiões de montanhas. Isso está provavelmente relacionado a condições que favorecem a esporulação e a sobrevivência de oocistos.

Existem indícios de um declínio na prevalência e taxa de infecção nos EUA e na Europa (Jones *et al.*, 2007a) e as razões sugeridas são: manutenção mais higiênica de chiqueiros; aumento da proporção de carne congelada; e educação em saúde.

Existem poucos relatos sobre a soroprevalência em crianças pequenas. Em um estudo com quinhentas crianças guatemaltecas de 3-10 anos de idade, anticorpos foram encontrados em 37,8%; a soroprevalência aumentou de 25% aos 3 anos de idade para 45% aos 5 anos de idade (Jones *et al.*, 2005). Souza e colaboradores (1987) encontraram grandes diferenças na soropositividade entre 608 escolares de duas localidades – Bonsucesso (166 crianças) e Jacarepaguá (442 crianças) – e dois grupos etários (6-8 anos e 12-14 anos) na cidade do Rio de Janeiro. Em geral, 68,4% das 608 crianças foram soropositivas (*indirect fluorescent antibody* – IFA, 1:16). Os resultados indicam uma taxa muito alta de transmissão pós-natal de *T. gondii* durante a infância.

Frenkel e colaboradores (1995) descobriram que 72 das 571 (12,6%) crianças na cidade do Panamá se soroconverteram entre 1 e 6 anos de idade.

A prevalência da infecção varia entre os grupos étnicos, mas isso é considerado secundário aos hábitos sanitários e de alimentação e não às diferenças genéticas. A maioria das pesquisas demonstrou uma prevalência rural maior do que a urbana, mas algumas não mostraram diferenças, e algumas acharam uma prevalência mais alta em indivíduos de áreas urbanas do que rurais (Dubey & Beattie, 1988). Uma prevalência maior foi encontrada em pessoas que tiveram muito contato com o solo e com animais (Dubey & Beattie, 1988). Além dos trabalhadores de abatedouros, descobriu-se que a infecção por *T. gondii* é comum em lixeiros (Dubey & Beattie, 1988).

Brasil – Soroprevalência

Historicamente, estudos populacionais de soroprevalência no Brasil demonstraram uma prevalência relativamente alta de anticorpos contra *T. gondii*. Por exemplo, Lamb e Feldman examinaram recrutas militares (de idade entre 16 e 39 anos, 73% abaixo dos 20 anos de idade) com amostras coletadas em 1964 em todo o Brasil e acharam uma soroprevalência de 52% (Lamb & Feldman, 1968). Walls e Kagan (1967) também examinaram essa população, mas usaram um teste de hemaglutinação indireta em lugar do teste de coloração utilizado por Lamb e Feldman, e descobriram taxas de soroprevalência de 12% a 55%, as mais altas das quais nas áreas do norte do Amazonas, Pará e Maranhão. Os estudos feitos por Walls e Kagan e Lamb e Feldman não são diretamente comparáveis porque diferentes testes foram usados; entretanto, ambos são populacionais e demonstram uma prevalência relativamente alta de anticorpos contra *T. gondii* numa população predominantemente de adultos jovens. Em 1975, Ricciardi e Sandoval relataram a prevalência de anticorpos contra *T. gondii* de vinte estados brasileiros testados por imunofluorescência indireta e descobriram positividade sorológica variando de 42,1% (0-5 anos de idade) a 84% (> 50 anos de idade), com a maior prevalência na região Sudeste do Brasil (Ricciardi & Sandoval, 1975). Embora os métodos de amostras não tenham sido descritos nesse relato, os resultados demonstram uma alta prevalência de infecção por *T. gondii* nas principais regiões do Brasil.

Não há estudos populacionais nacionais recentes sobre a prevalência de *T. gondii* no Brasil; entretanto, Pappas, Roussos e Falagas incluíram recentes artigos (1999-2008) que avaliaram a população de diferentes áreas da América Latina, incluindo o Brasil, na sua avaliação global da soroprevalência de *T. gondii* (Pappas, Roussos & Falagas, 2009). A maioria dos estudos brasileiros e latino-americanos demonstrou altas taxas de soropositividade, incluindo as populações indígenas (Bóia *et al.*, 2008), com a exceção de um estudo de Brasília (Cabral *et al.*, 2008), conforme observado por Pappas e colaboradores. Os autores especulam que Brasília pode possuir uma estrutura socioeconômica diferente da do resto do país porque é uma cidade recentemente construída para servir de capital federal. Demonstrou-se que o *status* socioeconômico correlaciona-se com a soroprevalência de *T. gondii* em uma cidade brasileira (Campos), sendo o grupo socioeconômico mais alto o de menores taxas de soroprevalência (Bahia-Oliveira *et al.*, 2003).

Quando analisados em conjunto, os estudos brasileiros de soroprevalência e de fatores de risco indicam uma taxa de infecção por *T. gondii* variável, mas relativamente alta, que pode estar associada com o solo, a água ou a alimentação, dependendo do local e de estudos específicos. Por causa da alta probabilidade de infecção por diversas fontes, e em razão da probabilidade de cepas virulentas do organismo levarem à doença ocular ou congênita, medidas preventivas de higiene devem ser integralmente praticadas (ver Prevenção e Controle, a seguir). Entretanto, mesmo com todas as medidas higiênicas, a infecção por meio do solo, da água e de alimentos contaminados por *T. gondii* pode ser difícil de evitar completamente. Por esta razão, parece que o melhor meio de prevenção seria o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz.

PREVENÇÃO E CONTROLE

Para prevenir a infecção por *T. gondii*, devem-se lavar as mãos com sabão e água após a manipulação de carne. Todas as tábuas de corte, pias, facas e outros materiais que entrarem em contato com a carne não cozida devem ser lavados com água e sabão porque os espécimes de *T. gondii* na carne podem ser mortos pela água. A carne de qualquer animal deve ser cozida até que a temperatura interna alcance 66ºC (Dubey *et al.*, 1990) antes do consumo humano ou animal, e deve-se evitar provar a carne enquanto está sendo cozida ou temperar salsichas feitas em casa. O tempo de cozimento varia com a espessura e o tipo de corte da carne, não sendo confiável o cozimento no forno de micro-ondas. O congelamento da carne a uma temperatura interna de -12ºC é eficaz para matar cistos teciduais; o congelamento da carne ao longo da noite em um congelador doméstico suficientemente frio é eficaz em matar a maior parte dos cistos teciduais. Salgar, curar, defumar e adicionar produtos à carne para realçar a cor e o sabor (soluções de realce) pode ter efeitos deletérios na viabilidade de *T. gondii* na carne, mas há muita variabilidade nos padrões destes procedimentos para que se possa fazer uma recomendação segura (Dubey *et al.*, 1997). Mulheres grávidas e pessoas imunossuprimidas, em especial, devem evitar contato com fezes de gatos, solo e carne crua. Gatos domésticos devem ser alimentados somente com comida seca, enlatada ou cozida. A caixa de resíduos do gato deve ser esvaziada todos os dias (para prevenir a esporulação de oocistos), preferivelmente não por uma mulher grávida ou pessoa imunossuprimida. Luvas devem ser vestidas durante a jardinagem, troca da caixa de resíduos do gato e durante o manuseamento de solos potencialmente contaminados com suas fezes. Os donos também devem ser aconselhados a manter seus cães longe dessas caixas de resíduos para prevenir a ingestão e transmissão pelos oocistos (Frenkel, Lindsay & Parker, 1995). Os vegetais devem ser bem lavados antes da ingestão porque podem ter sido contaminados por solo contendo fezes de gato. A irradiação a 50 krads ou o processamento de alta pressão a 400 MPa são efetivos em matar cistos teciduais (Dubey *et al.*, 1986; Dubey & Thayer, 1994) e oocistos (Dubey *et al.*, 1996; Dubey, 1998).

Para prevenir a infecção em gatos, eles nunca devem ser alimentados com carne não cozida, vísceras ou ossos, e esforços devem ser feitos para manter os gatos dentro de casa para prevenir a caça. Entretanto, se uma escolha tiver de ser feita, a carne congelada é menos contagiosa do que a carne fresca, e a carne bovina tem uma probabilidade menor de conter *T. gondii* do que a carne de cavalo, porco, carneiro ou a carne de caça selvagem. Como os gatos não podem extrair vitamina A de fontes vegetais, alguns donos alimentam seus gatos com fígado cru para melhorar a pele do animal. Essa prática deve ser interrompida porque os cistos teciduais de *T. gondii* frequentemente são encontrados no fígado de animais comestíveis, e porque as rações de gatos contêm os nutrientes mais essenciais e não há necessidade de alimentar os gatos com carne crua. As latas de lixo também devem ser cobertas para evitar que sejam manipuladas. Os gatos deveriam ser castrados para controlar a população felina.

Porcos e outros animais mortos devem ser removidos prontamente de chiqueiros para impedir o canibalismo entre os porcos e a manipulação pelos gatos. Carneiros que abortaram devido à toxoplasmose geralmente não apresentam abortos recorrentes por esta patologia e, portanto, podem ser salvos para procriação futura. Membranas fetais e fetos mortos não devem ser manuseados sem proteção e devem ser enterrados ou incinerados para prevenir a infecção de felinos e outros animais na fazenda. Os gatos não devem permanecer perto de ovelhas grávidas e cabras, e grãos devem ser cobertos para prevenir a contaminação por oocistos.

Para prevenir a infecção de animais de zoológico por *T. gondii*, os gatos, incluindo todos os felídeos selvagens, devem ser mantidos em um local separado de outros animais, particularmente marsupiais e macacos do Novo Mundo. Como regra, não se devem alimentar gatos com carne crua. A disseminação de oocistos de *T. gondii* no zoológico deve ser evitada devido a potencial exposição aos animais e pessoas. As vassouras, pás e outros

equipamentos usados para limpar as jaulas dos gatos e áreas delimitadas para gatos devem ser autoclavados ou aquecidos a 70ºC por pelo menos dez minutos. Durante a limpeza das jaulas, os cuidadores de animais devem utilizar máscaras e roupas de proteção.

REFERÊNCIAS

AVELINO, M. M. *et al.* Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in women of childbearing age. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 8: 164-174, 2004.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. *et al.* Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 9: 55-62, 2003.

BARBOSA, I. R.; CARVALHO XAVIER HOLANDA, C. M. & ANDRADE-NETO, V. F. Toxoplasmosis screening and risk factors amongst pregnant females in Natal, northeastern Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103: 377-382, 2009.

BOBIĆ, B. *et al.* Undercooked meat consumption remains the major risk factor for *Toxoplasma* infection in Serbia. *Parassitologia*, 49: 227-230, 2007.

BÓIA, M. N. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among Indian people living in Iauareté, São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 50: 17-20, 2008.

BONAMETTI, A. M. *et al.* Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30: 21-25, 1997a.

BONAMETTI, A. M. *et al.* Probable transmission of acute toxoplasmosis through breast feeding. *Journal of Tropical Pediatrics*, 43: 116, 1997b.

CABRAL, A. S. G. *et al.* Seroprevalence of toxoplasmosis in women of reproductive age in the city of Brasilia, capital of Brazil. *In*: INTERNATIONAL CONGRESS OF INFECTIOUS DISEASES, 13, 2008, Kuala Lumpur. *Abstracts 179...* Kuala Lumpur, jun. 2008.

CAVALCANTE, G. T. *et al.* Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in humans from rural Western Amazon, Brazil. *The Journal of Parasitology*, 92: 647-649, 2006.

COUTINHO, S. G.; LOBO, R. & DUTRA, G. Isolation of *Toxoplasma* from the soil during an outbreak of toxoplasmosis in a rural area in Brazil. *The Journal of Parasitology*, 68: 866-868, 1982.

COUTINHO, S. G. *et al.* Outbreak of human toxoplasmosis in a rural area. A three year serologic follow-up study. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 77: 29-36, 1982.

DESMONTS, G. *et al*. Étude épidémiologique sur la toxoplasmose: de l'influence de la cuisson des viandes de boucherie sur la fréquence de l'infection humaine. *Revue Française d'Études Cliniques et Biologiques*, 10: 952-958, 1965.

DUBEY, J. P. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in caprine livers and public health significance of toxoplasmosis in goats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 177: 1.203-1.207, 1980.

DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. *The Journal of Parasitology*, 84: 862-865, 1998.

DUBEY, J. P. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group LLC, 2009.

DUBEY, J. P. & BEATTIE, C. P. *Toxoplasmosis of Animals and Man.* Boca Raton: CRC Press, 1988.

DUBEY, J. P. & THAYER, D. W. Killing of different strains of *Toxoplasma gondii* tissue cysts by irradiation under defined conditions. *The Journal of Parasitology*, 80: 764-767, 1994.

DUBEY, J. P. *et al.* Effect of irradiation on the viability of *Toxoplasma gondii* cysts in tissues of mice and pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 47: 518-522, 1986.

DUBEY, J. P. *et al*. Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. *The Journal of Parasitology*, 76: 201-204, 1990.

DUBEY, J. P. *et al*. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *The Journal of Parasitology*, 81: 723-729, 1995.

DUBEY, J. P. *et al*. Killing of *Toxoplasma gondii* oocysts by irradiation and protective immunity induced by vaccination with irradiated oocysts. *The Journal of Parasitology*, 82: 724-727, 1996.

DUBEY, J. P. *et al.* Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *The Journal of Parasitology*, 83: 870-882, 1997.

DUBEY, J. P. *et al*. Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: unexpected findings. *International Journal for Parasitology*, 32: 99-105, 2002.

DUBEY, J. P. *et al*. Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. *The Journal of Parasitology*, 91: 1.082-1.093, 2005.

DUBEY, J. P. *et al.* Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology*, 139(11): 1.375-1.424, 2012.

ETHEREDGE, G. D. & FRENKEL, J. K. Human *Toxoplasma* infection in Kuna and Embera children in the Bayano and San Blas, eastern Panama. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 53: 448-457, 1995.

FRANCISCO, F. M. *et al.* Seroprevalence of toxoplasmosis in a low-income community in the Sao Paulo Municipality, SP, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 48: 167-170, 2006.

FRENKEL, J. K.; LINDSAY, D. S. & PARKER, B. B. Dogs as potential mechanical vectors of *Toxoplasma gondii*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 53: 226-226, 1995.

FRENKEL, J. K. *et al.* Transmission of *Toxoplasma gondii* in Panama City, Panama: a five-year prospective cohort study of children, cats, rodents, birds, and soil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 53: 458-468, 1995.

HEUKELBACH, J. *et al.* Waterborne toxoplasmosis, northeastern Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 287-289, 2007.

JACOBS, L.; REMINGTON, J. S. & MELTON, M. L. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Parasitology*, 46: 11-21, 1960.

JONES, J. L. *et al. Toxoplasma gondii* infection in rural Guatemalan children. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72: 295-300, 2005.

JONES, J. L. *et al.* Recently acquired *Toxoplasma gondii* infection, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 12: 582-587, 2006.

JONES, J. L. *et al. Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999-2004, decline from the prior decade. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77: 405-410, 2007a.

JONES, J. L. *et al.* Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 49: 878-884, 2007b.

KENAN, B. H.; KIMBALL, A. C. & CHRISTENSON, W. N. An epidemic of acute toxoplasmosis. *Jama*, 208: 1.002-1.004, 1969.

LAMB, G. A. & FELDMAN, H. A. A nationwide serum survey of Brazilian military recruits, 1964. III. *Toxoplasma* dye test antibodies. *American Journal of Epidemiology*, 87: 323-328, 1968.

LAMBERTON, P. H. L.; DONNELLY, C. A. & WEBSTER, J. P. Specificity of the *Toxoplasma gondii*-altered behaviour to definitive versus non-definitive host predation risk. *Parasitology*, 135: 1.143-1.150, 2008.

LUNDÉN, A. & UGGLA, A. Infectivity of *Toxoplasma gondii* in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking. *International Journal of Food Microbiology*, 15: 357-363, 1992.

MAGALDI, C. *et al.* Surto de toxoplasmose em um seminário de Bragança Paulista (Estado de São Paulo). Aspectos clínicos, sorológicos e epidemiológicos. *Revista de Saúde Pública de São Paulo*, 1: 141-171, 1967.

MAGALDI, C. *et al.* Epidemic of toxoplasmosis at a university in São José dos Campos, SP – Brazil. *Revista Latinoamericana de Microbiología y Parasitología*, 11: 5-13, 1969.

PAPPAS, G.; ROUSSOS, N. & FALAGAS, M. E. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*, 39: 1.385-1.394, 2009.

RICCIARDI, I. D. & SANDOVAL, E. F. D. Preliminary notes on the prevalence of human toxoplasmosis in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 69: 516-517, 1975.

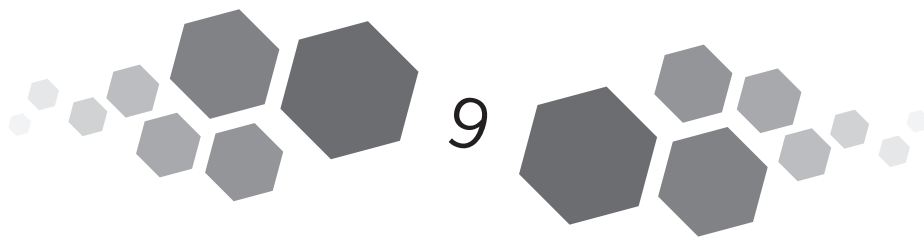
SILVA, D. S. *et al.* Prevalence of *Toxoplasma gondii* in chickens from an area in southern Brazil highly endemic to humans. *The Journal of Parasitology*, 89: 394-396, 2003.

SOUZA, W. J. S. *et al.* Epidemiological aspects of toxoplasmosis in school children residing in localities with urban or rural characteristics within the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82: 475-482, 1987.

TIRIBO, A. C. *et al.* Possível relação epidemiológica da toxoplasmose a água. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 16: 47-50, 1970.

WALLS, K. W. & KAGAN, I. G. Studies on the prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii*. 2. Brazil. *American Journal of Epidemiology*, 86: 305-313, 1967.

WEBSTER, J. P. Rats, cats, people and parasites: the impact of latent toxoplasmosis on behaviour. *Microbes and Infection*, 3: 1.037-1.045, 2001.

WEINMAN, D. & CHANDLER, A. H. Toxoplasmosis in swine and rodents. Reciprocal oral infection and potential human hazard. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 87: 211-216, 1954.

Diagnóstico Laboratorial da Toxoplasmose

Celso F. H. Granato • Inarei José Paulini Junior

A infecção por *Toxoplasma gondii* apresenta vários aspectos relevantes que tornam a abordagem diagnóstica no laboratório um contínuo desafio e uma renovação infindáveis (Candolfi *et al.*, 2007; Flori *et al.*, 2009; Garweg, 2005; Kasper *et al.*, 2009; Kodym *et al.*, 2007; Lefevre-Pettazzoni *et al.*, 2006; Petersen, 2005; Sensini, 2006).

As diversas formas de apresentação clínica, desde as assintomáticas até as formas localizadas, o acometimento durante a gestação e a possibilidade de transmissão para o feto, a ocorrência em pacientes imunodeprimidos são algumas das situações que fazem que o diagnóstico laboratorial assuma um aspecto de curiosidade constante e gere a necessidade de atualização frequente (Candolfi *et al.*, 2007; Flori *et al.*, 2009; Garweg, 2005).

Em razão de toda essa complexidade, desenvolveram-se numerosos recursos laboratoriais, e sua interpretação requer muito mais do que a análise isolada de cada um deles, seja sob a ótica da sensibilidade, da especificidade ou de qualquer parâmetro analítico. Há necessidade de avaliar os resultados de forma integrada e evolutiva, respeitando o momento provável da infecção e os limites de cada um dos recursos diagnósticos acessórios (Garweg, 2005; Kasper *et al.*, 2009).

Como em muitas outras situações da nosologia humana, o diagnóstico das doenças infecciosas pode ser abordado por uma 'via direta', que inclui a detecção do próprio microrganismo ou de suas partes constitutivas (proteínas, ácido nucleico), ou por 'vias indiretas' (detecção de anticorpos ou citocinas, por exemplo) (Kasper *et al.*, 2009; Kodym *et al.*, 2007; Lefevre-Pettazzoni *et al.*, 2006; Petersen, 2005; Sensini, 2006). Da mesma forma que nas demais situações médicas, a interpretação de qualquer resultado laboratorial também requer a integração de informações clínicas e epidemiológicas, e de outros dados laboratoriais, para que se possa chegar a um grau maior de consistência e o conjunto dos dados permita o maior valor preditivo possível (Garweg, 2005).

Assim, por exemplo, resultados laboratoriais de qualquer natureza, isolados, sem o apoio em dados clínicos e obtidos de um indivíduo de uma população de baixíssima prevalência de uma doença, têm valor preditivo muito diferente daquele obtido quando se emprega o mesmo recurso técnico, qualquer que seja ele, em paciente com forma clínica compatível e oriundo de uma população com elevada incidência de uma determinada doença (Garweg, 2005).

Dessa forma, esse posicionamento vai pautar a análise de todos os dados e técnicas aqui apresentados e, embora isso possa nos parecer óbvio, está na raiz de vários problemas interpretativos, quando passamos a empregar os diferentes recursos laboratoriais existentes à nossa disposição na solução prática de problemas na clínica.

DIAGNÓSTICO DIRETO

Essa abordagem diagnóstica visa a identificar a presença no plasma ou nos líquidos biológicos (líquido amniótico, humor aquoso, líquido cefalorraquidiano, entre outros) do próprio agente etiológico ou de componentes da estrutura do parasita (proteínas ou ácido nucleico).

O isolamento do toxoplasma não é realizado, na prática, com a finalidade de diagnóstico. O processo envolve a inoculação do material biológico mais frequentemente em culturas de células de rim de macaco verde africano (Vero). Esse procedimento requer instalações laboratoriais relativamente sofisticadas, que permitam a manutenção de células em cultura, e isso acarreta um custo considerável para cada teste individual (Garweg, 2005). Além disso, por ser um procedimento que envolve a inoculação do material biológico em cultura de células, a multiplicação do agente e, posteriormente, a identificação do agente (imunofluorescência, imunoperoxidase, detecção de ácido nucleico ou proteínas), o tempo para que todo esse processo ocorra é forçosamente longo e, consequentemente, inviabiliza seu uso clínico.

Outro recurso laboratorial direto que será apenas mencionado, tendo em vista ser de uso excepcional e restrito a poucos laboratórios de referência, é a detecção do parasita após a inoculação em células ou animais de laboratório. O material biológico pode ser inoculado em peritônio de camundongos e, após o período de incubação, detectado e identificado por técnicas de coloração direta ou técnicas moleculares (Garweg, 2005).

Na prática, o recurso direto mais empregado são as técnicas de biologia molecular, entre as quais as numerosas variantes de amplificação do DNA do toxoplasma, como a PCR (reação em cadeia da polimerase). Em linhas gerais, trata-se da construção de um segmento de DNA denominado *primer* ou iniciador, cuja sequência de bases é complementar a uma sequência do DNA do parasita que se quer identificar, denominada 'alvo'. Para que o procedimento tenha desde o início maior sensibilidade, escolhem-se sequências-alvo repetitivas. Em nosso caso específico, há dezenas de sequências-alvo já descritas (B1, RETg, AF146527), embora as mais empregadas na prática sejam o gene B1, repetido cerca de 35 vezes no genoma, e o gene AF146527, repetido de 250 a 300 vezes (Sensini, 2006).

Essa amplificação ocorre pela alternância de três ciclos: dissociação da dupla hélice de DNA do parasita por ação do calor; pareamento da sequência sintetizada B1, AF ou outra com o segmento-alvo; duplicação da sequência-alvo por ação da DNA polimerase. As temperaturas usadas no processo podem ser discretamente diferentes, as enzimas empregadas para duplicação da sequência-alvo podem ser distintas e o número de ciclos pode também ser diferente. Além desse modelo tradicional de PCR, foram descritos vários protocolos de PCR em tempo real, em que o sinal decorrente da duplicação do DNA é emitido e captado a cada vez que é gerado, não sendo necessário acompanhar a reação até o fim (de 35 a 40 ciclos). O coeficiente de variação desse tipo de amplificação é muito menor do que o observado na PCR convencional, levando a valores de detecção muito mais precisos.

Assim, foi descrita uma pletora de protocolos diferentes, alguns dos quais são comercializados ou tiveram desenvolvimento 'caseiro' (*in house*). Em decorrência dessa diversidade, a comparação entre esses protocolos é difícil, e os resultados obtidos com eles devem ser comparados com muito cuidado.

Outra fonte de variação entre os vários tipos de PCR refere-se ao processo de revelação do produto amplificado. Este pode ser visualizado pelo emprego de um produto que se intercala entre as hélices do DNA (brometo de etídio

ou Sybr Green) ou de uma sonda do tipo Taqman, que emite um sinal após cada amplificação do material genético (PCR em tempo real).

Para se ter uma ideia mais clara da variedade de protocolos de PCR, em 2009 foi publicado um trabalho em que se identificaram, apenas nos 25 laboratórios da França que realizam o teste, 35 processos discretamente diferentes quanto a uma ou mais características. Nove desses centros usavam dois e até três processos distintos. Entretanto, em análise mais ampla, pode-se afirmar que os testes moleculares são bastante sensíveis, especialmente se aplicados entre a 18ª e a 21ª semana de gestação e pelo menos seis semanas após a infecção materna, para que haja tempo de o processo de infecção do feto ocorrer (se é que vai ocorrer) e o material genético do parasita poder ser detectado no líquido amniótico, no caso de uma infecção durante a gestação. Protocolos foram desenvolvidos para aplicação no líquido cefalorraquidiano, no humor aquoso e no sangue (Garweg, 2005).

Há uma tendência atualmente de liberar resultados quantitativos desde que se disponha de uma curva de calibração, com quantidades conhecidas de DNA. Por sua vez a detecção pura e simples do DNA do parasita já é forte indicativo de infecção. Voltamos a enfatizar que resultados, especialmente os quantitativos, obtidos com procedimentos diferentes não devem ser comparados.

As técnicas moleculares têm sido empregadas também para o diagnóstico de infecções oculares, do sistema nervoso central e de material de biópsias (Garweg, 2005; Kasper *et al*., 2009; Kodym *et al*., 2007; Lefevre-Pettazzoni *et al*., 2006; Petersen, 2005; Sensini, 2006). Entretanto, é preciso que as metodologias empregadas sejam validadas para emprego nesses materiais clínicos distintos, e se deve tomar o cuidado de amplificar um gene constitutivo (tipo betaglobina) para validar a realização do teste e seu resultado.

Outra recomendação que nos parece relevante é a de que a detecção do DNA do parasita na amostra clínica não é sinônimo de má-formação fetal; ela indica forte probabilidade de infecção do feto ou a presença do parasita em outro liquido biológico (liquor, humor aquoso), porém não é forçosamente indicativa de lesão (Garweg, 2005; Kasper *et al*., 2009; Kodym *et al*., 2007; Lefevre-Pettazzoni *et al*., 2006; Petersen, 2005; Sensini, 2006).

DIAGNÓSTICO INDIRETO

A forma mais amplamente difundida de diagnóstico e mais empregada na prática clínica é a pesquisa de anticorpos. Nesse aspecto, existem várias técnicas que se utilizam de características distintas de abordagem (neutralização, imunoquímica) e que permitem até mesmo caracterizar o isótipo e a subclasse do anticorpo detectado (Kasper *et al*., 2009).

A técnica considerada padrão-ouro do diagnóstico é a reação de Sabin-Feldman ou teste do corante (*dye test*) (Kasper *et al*., 2009). Esse procedimento trabalha com toxoplasmas vivos e diluídos em concentrações decrescentes do soro a ser testado. Os anticorpos contidos no soro, na presença de complemento, irão neutralizar taquizoítas vivos; e o corante (azul de metileno) presente na amostra não penetrará no parasita. Caso não haja anticorpos no soro, o corante será captado pela célula do parasita, que adquirirá um tom azulado. O título final será a maior diluição que evita a captura do corante.

Embora assim descrita pareça simples, essa técnica depende do controle rigoroso de numerosos fatores, especialmente da manutenção de toxoplasmas vivos em animais ou em cultura de células, além do preparo diário do corante, a subjetividade da leitura, o que a torna de difícil uso rotineiro fora de laboratórios de referência e pesquisa. Entretanto, é com essa técnica que todas as demais devem ser comparadas sempre que for descrita nova metodologia para detecção de anticorpos (Garweg, 2005; Kasper *et al*., 2009).

Os recursos mais amplamente utilizados na prática são as técnicas chamadas de fase sólida, uma vez que empregam uma superfície plástica sobre a qual são fixados antígenos do toxoplasma. Esses diferentes antígenos da estrutura do parasita, dependendo das várias técnicas descritas, capturam os anticorpos presentes na amostra analisada, e a ligação antígeno-anticorpo é revelada na sequência, pelo emprego de outro processo imunológico (anticorpo de outra espécie animal dirigido contra a imunoglobulina humana) e pela emissão de um sinal (uma cor, uma radiação luminescente, por exemplo), medido por um sensor (Kasper *et al*., 2009; Kodym *et al*., 2007).

Os antígenos empregados nessa fase sólida são selecionados com base em sua capacidade de gerar anticorpos na infecção natural, predominantemente na fase aguda. Alguns produtos comerciais empregam antígenos de fases um pouco mais precoces, enquanto outros utilizam antígenos de fases um pouco mais tardias da infecção. Essa seria uma das razões pelas quais existem algumas diferenças entre os métodos (Kasper *et al*., 2009; Kodym *et al*., 2007; Lefevre-Pettazzoni *et al*., 2006; Petersen, 2005; Sensini, 2006).

Da mesma forma, dependendo da natureza do sinal gerado pelo complexo imunológico formado e captado pelo sensor, essas técnicas poderão ser mais ou menos sensíveis (Garweg, 2005; Kasper *et al*., 2009). Nos últimos 15 anos houve uma tendência por parte dos fabricantes dos conjuntos diagnósticos (*kits*) para desenvolver testes com sensibilidade cada vez maior; isso ocorreu em consequência da maior sobrevida dos pacientes com várias formas de imunocomprometimento (HIV-soropositivos, pacientes submetidos a transplantes de órgãos, entre outros), que requerem testes mais sensíveis para detectar a pequena quantidade de anticorpos que produzem. A contrapartida disso é que os testes comprometeram, dessa forma, sua especificidade, uma vez que não existe forma de aumentar a sensibilidade de um teste sem que haja algum comprometimento da especificidade, considerando-se a própria natureza da resposta imune e a curva de sinal-resposta dos testes diagnósticos.

Assim, ao se detectarem moléculas das classes IgM ou IgA com sensibilidades cada vez maiores, passaram-se a detectar também moléculas dirigidas contra outros antígenos semelhantes, porém distintos daqueles do toxoplasma, gerando reações falsamente positivas. Além disso, e de forma ainda mais relevante, mesmo as moléculas de IgM e IgA específicas que, no passado, eram consideradas marcadores de doença recente, passaram a ser detectadas, graças à maior sensibilidade das técnicas em uso atualmente, por muitos anos depois da doença aguda, descaracterizando-as, portanto, como marcadores de doença recente. Dessa forma, toda vez que se identificam marcadores sorológicos de doença recente (IgM e IgA), é imprescindível que se avalie se isso realmente indica infecção recente ou, alternativamente, a persistência de uma molécula por anos após a infecção aguda (Sensini, 2006).

Uma vez que existe grande quantidade de produtos comercializados para identificação das imunoglobulinas, vamos ater-nos à discussão de aspectos mais genéricos, de interpretação dos resultados obtidos, sem fixar-nos demasiadamente nos produtos em si, já que as comparações citadas na literatura especializada nem sempre são realizadas segundo a técnica padrão-ouro e podem estar sujeitas a interpretações variadas pelos autores. Também não seria o escopo deste capítulo discutir uma série de resultados observados no emprego de outros antígenos nos testes diagnósticos, ainda não disponíveis na prática, porém não menos interessantes e eventualmente capazes de originar testes melhores no futuro. Cabe ressaltar aqui a colaboração nesse aspecto de alguns grupos brasileiros de pesquisa que têm contribuído significativamente para a geração de conhecimentos.

Antes de tratarmos diretamente da avaliação da produção de anticorpos contra *T. gondii* é preciso enfatizar um dos princípios fundamentais da patologia clínica, segundo o qual a avaliação prospectiva da produção de anticorpos contra qualquer agente infeccioso deve ser feita com o emprego da mesma técnica laboratorial, avaliando-se em paralelo – na mesma corrida – as amostras sob análise. Esse princípio básico é frequentemente esquecido, e isso se transforma em mais uma fonte de confusão na análise de resultados obtidos em pacientes ou em situações específicas.

Dinâmica da Produção de Anticorpos Anti-*T. gondii*

Entre 15 e 40 dias, aproximadamente, após a infecção, já é possível detectar anticorpos dirigidos contra o parasita no soro obtido de sangue periférico. Nesse primeiro momento, os anticorpos são principalmente das classes IgM e IgA, e, embora essa produção não pudesse ser documentada com as técnicas usadas no passado, elas ocorrem e perduram por muitos meses e até anos após a infecção aguda. Essa é a razão pela qual, em face de um resultado de IgM ou IgA positivo, a principal preocupação deve ser determinar se elas representam episódio recente ou a continuidade de produção (durante meses ou anos) após a infecção original (Sensini, 2006).

Entre uma e quatro semanas após o início da produção dos anticorpos das classes IgM e IgA, ocorre o chamado *switch* de isótipo e se inicia a produção de IgG. Inicialmente, são produzidos anticorpos de baixa avidez e, após cerca de três a quatro meses, os anticorpos da classe IgG produzidos são de alta avidez na ligação com os antígenos (Sensini, 2006).

Análises realizadas com o fracionamento de preparações antigênicas de *T. gondii* revelaram que os anticorpos da classe IgM e IgG se dirigem principalmente contra três antígenos de pesos moleculares de 32 mil, 22 mil e seis mil dáltons. Além disso, os anticorpos da classe IgG apresentam um leque de reatividades muito mais amplo, podendo identificar outras 17 frações antigênicas, além daquelas que também reagem com a IgM.

Os anticorpos da classe IgG costumam permanecer detectáveis pelo restante da vida dos indivíduos, embora eles possam, em determinadas situações, atingir níveis muito baixos e não ser mais detectados por uma ou outra metodologia (Sensini, 2006).

Procedimentos Laboratoriais para Detecção dos Anticorpos

Várias técnicas permitem a detecção de anticorpos na fase inicial, entre as quais a quimioluminescência, a imunofluorimetria e os ensaios imunoenzimáticos em geral (aqui chamados genericamente de EIE ou Elisa) (Kasper *et al*., 2009; Kodym *et al*., 2007; Lefevre-Pettazzoni *et al*., 2006; Petersen, 2005; Sensini, 2006). Conquanto sejam de uso rotineiro para as IgGs, não existem padrões universalmente aceitos para a quantificação das imunoglobulinas M e A, o que dificulta comparações mais perfeitas.

Quando comparados entre si e com o teste padrão-ouro, as diferentes técnicas para detecção de IgM revelam sensibilidades relativas entre 90% e 100%, aproximadamente, e especificidades entre 75% e 95% (Kasper *et al*., 2009). A concordância média entre as técnicas gira ao redor de 92,4%. Há testes calibrados para detectar anticorpos de fase mais recente do que outros e, em função disso, passam a ter sensibilidades e especificidades discretamente diferentes. Novamente, essa comparação entre técnicas deve ser feita com muito cuidado, com amostras bem conhecidas, antes de se tomarem decisões definitivas.

Uma vez mais, é importante relembrar que a positividade da IgM, especialmente mas não exclusivamente na ausência de IgG, não indica obrigatoriamente diagnóstico de toxoplasmose aguda, ainda que em concentrações por vezes elevadas. Caso não ocorra soroconversão de IgG nas poucas semanas seguintes à identificação da IgM, esse resultado será considerado falsamente positivo. Quando a IgG é positiva, ao lado da IgM, há necessidade de testes adicionais para saber se esse resultado é verdadeiramente positivo e mesmo se se trata de IgM associada a uma infecção recente (teste de avidez, outras técnicas para detecção de IgM) (Candolfi *et al*., 2007; Flori *et al*., 2009; Garweg, 2005; Kasper *et al.*, 2009; Kodym *et al*., 2007; Lefevre-Pettazzoni *et al*., 2006).

A produção de anticorpos da classe IgA segue dinâmica semelhante à da IgM. O início da produção é praticamente concomitante ao da IgM e, habitualmente, ela permanece detectável por cerca de quatro meses. Entretanto, há estudos

que demonstram sensibilidade inferior em relação às técnicas para detecção de IgM e, além disso, permanência de IgA por período superior a um ano. Dessa forma, o perfil IgM+/IgA negativo não exclui a possibilidade de infecção aguda, e o perfil IgM+/IgA+ não caracteriza infecção aguda (particularmente se a IgG for negativa). A negatividade dos dois marcadores, entretanto, torna a possibilidade de infecção aguda bastante remota em pacientes imunocompetentes. Com os dados disponíveis atualmente, não há razões para interpretar esses perfis de forma distinta entre as gestantes.

Embora muito menos comumente realizada do que as determinações de IgM e IgG, a avaliação das IgAs constitui solicitação relativamente frequente aos laboratórios de rotina e é muitas vezes realizada por laboratórios de referência na tentativa de esclarecer casos difíceis. Essa determinação pode ser feita pela técnica de ISAGA (*immunosorbent agglutination assay* – ensaio imunoabsorvente de aglutinação) ou, mais frequentemente, por técnicas imunoenzimáticas (Kasper *et al*., 2009).

A produção da IgA costuma ser detectável logo após o início da produção de IgM, eventualmente uma semana depois, e permanece detectável por longos períodos, eventualmente um ano ou mais. Embora com as técnicas mais tradicionais esse período de detectabilidade se restrinja a quatro meses aproximadamente e, portanto, se caracterize como um marcador mais fiel de doença recente do que a IgM, o uso de técnicas mais modernas e sensíveis acabou revelando que a produção de IgA também permanecia após a fase inicial da doença (Kodym *et al*., 2007). Por essa razão, acredita-se que a contribuição que a detecção de IgA traz seja, na prática, menor do que a trazida de fato no passado.

Com relação à produção de IgG, com o emprego das técnicas de fase sólida, a detecção se torna possível logo após o início da produção de IgM, seguindo-se ao *switch* de isótipo (Kodym *et al*., 2007; Lefevre-Pettazzoni *et al*., 2006; Petersen, 2005; Sensini, 2006). Isso ocorre cerca de uma a três semanas após o início da produção de IgM. Inicialmente, essas moléculas produzidas são pouco ávidas na ligação com os antígenos e, ao longo dos primeiros três a quatro meses após a infecção, ocorre uma seleção de linfócitos B que produzem IgGs que se ligam com maior avidez ao antígeno. Essa dinâmica pode ser usada para determinar se os anticorpos da classe IgM produzidos são aqueles associados à fase aguda (quando as IgGs são de baixa avidez) ou aqueles residuais que continuam a ser produzidos anos após a infecção (quando as IgGs são de alta avidez). No caso específico da gestação, é importante que as grávidas realizem o primeiro teste até a 16ª semana de gestação, pois, caso sejam detectados concomitantemente anticorpos das classes IgM e IgG, existe a possibilidade de avaliar o grau de avidez dos anticorpos da classe IgG e verificar se a infecção ocorreu antes ou após a concepção (Candolfi *et al*., 2007; Flori *et al*., 2009; Garweg, 2005; Kasper *et al*., 2009; Kodym *et al*., 2007; Lefevre-Pettazzoni *et al*., 2006).

Há relatos na literatura especializada segundo os quais a introdução de terapêutica específica contra o toxoplasma pode alterar a dinâmica do processo de geração de anticorpos de alta avidez. Porém, ainda não está bem documentado em que medida a introdução de drogas afetaria a interpretação dos níveis de avidez.

Mais recentemente, têm sido descritos casos de pessoas cujo processo de amadurecimento das IgGs não evolui, ou seja, ao longo dos anos o nível de avidez não se altera substancialmente, sem que isso indique imunodeficiência. Segundo alguns autores, esse fenômeno poderia ocorrer em até 5% das gestantes. Dessa forma, os autores que abordam a questão diagnóstica são unânimes em afirmar que não se devem tomar medidas definitivas com base apenas em uma determinação isolada, de baixa avidez de IgG (Lefevre-Pettazzoni *et al*., 2006). Como regra geral, o nível elevado não traria maiores dificuldades interpretativas.

Assim, caso os níveis de avidez não se elevem significativamente transcorridas de quatro a seis semanas, é possível que as mulheres incluídas naquele percentual tenham uma característica tal em seu sistema imune que esse processo de auxílio ao diagnóstico não possa ser empregado.

Atualmente, existem laboratórios que fazem uso de técnicas próprias de avaliação de avidez, ao passo que outros usam conjuntos comercializados. Dessa forma, não se recomendam comparações entre índices de avidez obtidos com metodologias ou procedimentos distintos. Para que a avaliação do grau de avidez possa ser realizada, é necessário, obviamente, que a dosagem de IgG seja positiva, com uma taxa de pelo menos 15 UI/ml, para que seja possível uma interpretação minimamente confiável (Candolfi *et al*., 2007).

Outra técnica de fase sólida recentemente lançada, porém ainda não disponível entre nós, é a técnica de *Western blot*. Nessa técnica, antígenos purificados a partir do parasita são separados em uma camada de gel produzido com substâncias dissociantes e sob ação de uma carga elétrica. A seguir, os antígenos separados são transferidos a uma membrana de nitrocelulose (fase sólida) empregando-se, novamente, uma carga elétrica. Dessa forma, os antígenos formam uma coluna proteica na nitrocelulose, que é cortada em tiras com cerca de 0,5 cm de largura por 8-10 cm de extensão. Na etapa seguinte da reação, o soro dos pacientes sob análise, diluído numa solução apropriada, é aplicado às tiras de nitrocelulose; caso existam anticorpos no soro, eles se ligarão aos antígenos dissociados sobre a fase sólida, numa típica reação antígeno-anticorpo. Essa reação será revelada posteriormente pela adição de um complexo formado pela fusão de um anticorpo anti-IgG humana produzido em animais (como coelho ou cabra, por exemplo) com uma enzima (mais comumente peroxidase). Após uma etapa de lavagem, todo esse conjunto de proteínas (antígeno parasitário-anticorpo humano-anticorpo animal + peroxidase) é revelado pela adição de um produto formado por um substrato da peroxidase e que, ao ser desdobrado por ela, resulta em uma substância insolúvel. Esta se precipita na nitrocelulose, formando um 'borrão' (*blot)*. Nesse momento, pode-se observar desde nenhum borrão até vários borrões, que, devidamente interpretados, indicarão a presença ou não de anticorpos específicos contra *T. gondii*. Segundo alguns trabalhos citados na literatura, essa técnica apresenta elevada sensibilidade e especificidade quando comparada ao *dye test.*

Uma última técnica usada para detecção de imunoglobulinas em geral (IgM, IgG, IgA e IgE) e que é útil como técnica de fase sólida é o ISAGA (Candolfi *et al*., 2007; Kasper *et al*., 2009; Sensini, 2006). É restrito a laboratórios de referência, mas, por ser frequentemente citado, consideramos oportuno descrevê-lo aqui. Trata-se do emprego de uma microplaca de material plástico (fase sólida) com 96 orifícios, a cujas paredes internas são adsorvidos anticorpos produzidos em animais (coelhos, cabras, entre outros) e dirigidos contra regiões específicas de cada tipo de isótipo de imunoglobulina que se queira detectar (existem ISAGAs para detecção de IgG, IgM, IgA, IgE). A seguir, incuba-se o material sob avaliação. Seguem-se uma lavagem e incubação com antígenos do parasita. Se houver aglutinação (avaliada visualmente e de forma semiquantificada), a reação será considerada positiva para aquele isótipo; caso contrário, será negativa para esse mesmo isótipo.

Ainda que restritas a laboratórios de referência, existem algumas técnicas de avaliação de IgG empregadas para definir a época em que teria ocorrido a infecção toxoplásmica, especialmente no seguimento da gestação. Uma delas é a aglutinação diferencial ou AC/HS. Essa técnica consiste na avaliação da produção de IgG com antígenos do parasita extraídos com acetona (AC) ou formalina (HS). Os anticorpos da classe IgG que se dirigem contra antígenos AC são produzidos mais precocemente em relação aos antígenos HS. Dessa forma, estabelece-se uma razão entre os títulos obtidos com o uso de antígenos AC e os títulos obtidos com antígenos HS. Esses títulos caracterizam um padrão que predomina no primeiro ano pós-infecção e outro distinto após esse período, e permitem determinar se a infecção ocorreu há mais de um ano ou há menos de um ano.

Embora esse recurso seja amplamente utilizado pelos laboratórios de referência, o acesso aos antígenos é muito restrito e, na prática, requer muita experiência para permitir conclusões sobre a época em que ocorreu a infecção aguda, ou seja, entre três e quatro meses após o início da gestação, ou antes da concepção.

Outras técnicas para detecção de IgG (imunofluorescência indireta, hemaglutinação, entre outras), embora amplamente empregadas no passado, caíram em desuso, seja por terem menor sensibilidade, seja por não estarem mais disponíveis comercialmente, seja por restrições técnicas de uso. Alguns profissionais alegam que no passado havia menos dificuldades diagnósticas do que agora, depois do aparecimento de técnicas mais modernas, mais sensíveis e menos específicas. Embora, por vezes, seja difícil avaliar o benefício real desses recursos, muitos pacientes acabaram sendo diagnosticados e tratados em virtude da maior sensibilidade de detecção. De qualquer modo, desde que cuidadosamente empregadas e com bom senso, as novas tecnologias são muito produtivas, e seu uso, em certa medida, inexorável.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA TOXOPLASMOSE OCULAR

Ao longo dos anos, tem sido um desafio diagnóstico a confirmação laboratorial da suspeita clínica de toxoplasmose ocular. Essa apresentação da doença pode ser decorrente de uma infecção congênita ou de uma forma adquirida pós-natal. A fisiopatologia da doença é bastante complexa, e tem sido abordada em diversos trabalhos com a colaboração valiosa de grupos brasileiros. Aqui, não se pretende discutir esse aspecto do diagnóstico, o que será feito em outra parte do livro. Faremos, então, um sumário das técnicas laboratoriais que têm sido empregadas para confirmar o diagnóstico clínico da toxoplasmose ocular, ou para refutá-lo, discutindo vantagens e limitações de cada um dos procedimentos.

Sempre relevantes nessa discussão são as características do estado imune do paciente (imunocompetente ou comprometido) e até mesmo sua origem, uma vez que parece haver diferenças entre pacientes de climas tropicais e pacientes de climas temperados, considerando que a forma mais comum de aquisição da infecção possa apresentar diferenças em decorrência dessa característica. Parece também ter significado relevante a quebra da barreira uveovascular, na medida em que o cálculo da produção local de anticorpos pode ser afetado pela integridade ou não dessa barreira (Garweg, 2005).

Uma vez que, para que ocorra a toxoplasmose ocular é imprescindível que tenha havido infecção sistêmica, a sorologia (pesquisa de anticorpos) no sangue periférico deve ser positiva, a menos que se trate de paciente imunocomprometido.

Uma das abordagens laboratoriais mais comumente utilizadas nesse diagnóstico é a verificação dos níveis de anticorpos no humor aquoso (Garweg, 2005). Considera-se que a produção de IgM no humor aquoso é extremamente baixa e, na prática, o uso desse recurso acaba sendo muito restrito.

Se os níveis de anticorpos da classe IgG no humor aquoso forem relativamente mais elevados do que os do soro, poderá estar havendo produção local de anticorpos e isso é considerado um sinal indireto de infecção ocular. Para que a ocorrência da síntese local de anticorpos seja confirmada, calcula-se o índice de Goldmann-Witmer (Garweg, 2005), também conhecido como coeficiente de Witmer-Desmonts, que leva em conta:

a) título de anticorpos da classe IgG contra toxoplasma do humor aquoso;

b) concentração de IgG total do humor aquoso;

c) título de anticorpos da classe IgG contra toxoplasma do soro;

d) concentração de IgG total do soro.

Calcula-se o coeficiente de Witmer-Desmonts pela fórmula a/b x d/c. Valores superiores a três sugerem produção local de anticorpos, enquanto valores inferiores a três sugerem transferência passiva de anticorpos do soro.

Dependendo do critério de seleção dos casos, a sensibilidade desse índice varia entre 60% e 85%, e a especificidade é de aproximadamente 90%. Caso se inclua no cálculo os valores de IgA do humor aquoso e do soro, ainda que a sensibilidade específica do índice para IgA seja inferior, no somatório haverá acréscimo da sensibilidade, que poderia atingir 90% (Garweg, 2005).

TÉCNICAS MOLECULARES

A discussão sobre as indicações e a fisiopatologia da toxoplasmose ocular encontra-se no capítulo 14. Aqui, discutiremos apenas o significado dos achados, sensibilidade e especificidades das técnicas descritas.

Levando-se em conta que a presença do toxoplasma é um dos fatores desencadeadores da doença, mas que o processo inflamatório daí decorrente é que teria papel fundamental na lesão em si, estima-se que a sensibilidade da PCR para o diagnóstico da toxoplasmose ocular, pela análise do humor aquoso de pacientes imunocompetentes, seja da ordem de 25%. Para o humor vítreo, esse valor seria de 50%. Em pacientes imunocomprometidos, a sensibilidade do humor aquoso seria de 75%, sempre levando em consideração as limitações advindas de diferenças nos detalhes dos diversos tipos de PCR descritos na literatura (Candolfi *et al.*, 2007; Flori *et al.*, 2009; Garweg, 2005; Kasper *et al.*, 2009; Kodym *et al.*, 2007; Lefevre-Pettazzoni *et al.*, 2006; Petersen, 2005; Sensini, 2006).

Fundamental também seria considerar a amplificação concomitante de genes constitutivos da célula humana (também chamados de *housekeeping genes*) para garantir a credibilidade dos processos de extração, amplificação e detecção do DNA parasitário.

REFERÊNCIAS

CANDOLFI, E. *et al*. IgG avidity assay firms up the diagnosis of acute toxoplasmosis on the first serum sample immunocompetent pregnant women. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 58: 83-88, 2007.

FLORI, P. *et al*. Sérologie de la toxoplasmose chez la femme enceinte: caractéristiques et pièges. *P. Annales de Biologie Clinique*, 67(2): 125-133, 2009.

GARWEG, J. G. Determinants of immunodiagnostic success in human ocular toxoplasmosis. *Parasite Immunology*, 27: 61-68, 2005.

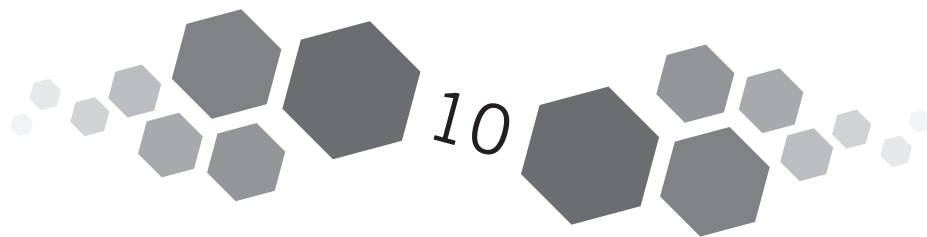
KASPER, D. C. *et al*. Evaluation of the Vitros ECiQ immunodiagnostic system for detection of anti-toxoplasma immunoglobulin G and immunoglobulin M antibodies for confirmatory testing for acute *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(1): 164-167, 2009.

KODYM, P. *et al*. Evaluation of a commercial IgE ELISA in comparison with IgA and IgM ELISAs, IgG avidity assay and complement fixation for the diagnosis of acute toxoplasmosis. *Clinical Microbiology and Infection*, 13: 40-47, 2007.

LEFEVRE-PETTAZZONI, M. *et al*. Delayed maturation of immunoglobulin G avidity: implication for the diagnosis of toxoplasmosis in pregnant women. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 25: 687-693, 2006.

PETERSEN, E. European multicenter study of the LIAISON automated diagnostic system for determination of *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G (IgG) and IgM and the IgG avidity index. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(4): 1.570-1574, 2005.

SENSINI, A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. *Clinical Microbiology and Infection*, 12: 504-512, 2006.

10

Toxoplasmose Congênita

Cléa Carneiro Bichara • Gláucia M. Queiroz de Andrade • Eleonor Gastal Lago

A toxoplasmose está se tornando cada vez mais evidente como problema de saúde pública de grande impacto no binômio mãe-filho, sobretudo nos países tropicais com condições ambientais propícias para a alta prevalência da doença.

Quando a infecção por *Toxoplasma gondii* acomete mulheres pela primeira vez durante a gravidez, há possibilidade de ocorrer a transmissão materno-fetal do parasita resultando em casos de toxoplasmose congênita. O risco da transmissão depende de vários fatores, sobretudo do período gestacional em que ocorreu a infecção materna. A maioria das crianças com toxoplasmose congênita apresenta desenvolvimento normal, porém pode ocorrer comprometimento neurológico e visual com danos permanentes.

EPIDEMIOLOGIA

A toxoplasmose é uma das parasitoses mais comuns nos seres humanos. Os felinos são os hospedeiros definitivos de *T. gondii*, e o homem e outros animais são hospedeiros intermediários. A infecção é comum nos países tropicais, e a prevalência varia de região para região, refletindo diferentes estilos de vida e hábitos que favorecem a exposição às fontes da infecção. Dois estágios de *T. gondii* estão presentes nos tecidos do hospedeiro humano. O taquizoíta, forma de multiplicação rápida do parasita, é patogênico durante a infecção inicial; o bradizoíta, forma de multiplicação lenta, é encontrado dentro dos cistos tissulares no indivíduo com infecção crônica. O cisto tissular em indivíduos imunodeficientes e nos infectados congenitamente pode ser causa de recrudescência da infecção (Gilot-Fromont *et al.*, 2012; Remington *et al.*, 2011).

A maioria da população de *T. gondii* que infecta homens e animais pode ser agrupada em três genótipos denominados tipo I, II e III. Menos de 5% dessa população apresenta genótipos únicos com divergência na sequência de DNA em relação às linhagens clonais, sendo consideradas 'exóticas' ou 'atípicas'. Observa-se diferença na distribuição geográfica dessa população, predominando o tipo II na Europa e na América do Norte, e o tipo I e linhagens atípicas,

mais virulentas, na América do Sul. Essa diferença pode ser uma das explicações para a maior gravidade das manifestações oculares observadas entre as crianças com infecção congênita no Brasil (Gilbert *et al*., 2008).

O ser humano é infectado principalmente pelas vias oral e transplacentária e, raramente, por transfusão de sangue, transplante de órgãos ou acidentes em laboratório. A transmissão oral ocorre pela ingestão de cistos do parasita contidos na carne crua ou malcozida ou pela ingestão de oocistos presentes na terra, água ou alimentos contaminados com fezes de gatos infectados (Dubey *et al.*, 2012; Gillot-Fromont *et al.*, 2012). Reservatórios de água contaminados têm-se mostrado importantes na epidemiologia da toxoplasmose (Bahia-Oliveira *et al*., 2003).

Nas regiões de maior transmissão, a prevalência da infecção congênita é maior e o primeiro contato com *T. gondii* (primoinfecção) ocorre precocemente, ainda na infância. Este é o cenário observado no Brasil. Nos países desenvolvidos do hemisfério norte, a primoinfecção geralmente ocorre na adolescência ou na vida adulta. A prevalência da infecção aumenta com a idade, resultado do risco acumulado de exposição, e não varia entre os sexos. A toxoplasmose pode ocorrer em surtos associados ao consumo de água contaminada com oocistos ou de carne com cistos do parasita e ingerida crua ou malcozida (Bahia-Oliveira *et al.*, 2001; Dubey *et al.*, 2012). Nessas ocasiões ocorrem muitos casos de toxoplasmose aguda e de toxoplasmose congênita.

Em imunocomprometidos (pacientes com Aids, submetidos a quimioterapia para tratamento do câncer, transplantados), a toxoplasmose geralmente decorre da reativação de uma infecção latente preexistente, as manifestações clínicas podem ser graves e, embora incomum, pode ocorrer infecção fetal (Andrade *et al*., 2010). Mulheres imunocompetentes com infecção crônica podem apresentar reativação de lesão ocular durante a gravidez, mas, até o momento, essa reativação não parece significar risco de infecção para o feto (Noble *et al.*, 2010).

Prevalência da Toxoplasmose na Gestante

A prevalência da toxoplasmose varia amplamente em todo o mundo (de < 10% a > 90%), mas desde 1960 essa taxa parece estar em declínio nos Estados Unidos e na Europa, provavelmente devido a melhores condições de vida, educação da população e redução da infecção nos animais utilizados para consumo pelo homem. No Brasil, a prevalência na população em geral varia de 54% a 83% e, recentemente, em São Paulo, observou-se uma tendência de queda nessas taxas (Vaz *et al*., 1990). O Brasil, por seu clima tropical, apresenta condições favoráveis à disseminação da toxoplasmose, com elevada prevalência em gestantes, embora ocorram variações regionais (Tabela 1).

Em estudos epidemiológicos, observa-se a associação entre a exposição a alguns fatores de risco e o desenvolvimento da infecção por *T. gondii*. São estes os principais fatores de risco: contato com gatos adultos ou filhotes (Rey & Ramalho, 1999; Spalding *et al*., 2003; Kapperud *et al*., 1996; Baril *et al*., 1999); contato com caixas de areia onde são depositados dejetos de gatos (Kapperud *et al*., 1996); consumo ou contato com carne crua ou malcozida (de porco, de carneiro, de caça, de boi) (Kapperud *et al*., 1996; Baril *et al*., 1999; Cook *et al*., 2000; Avelino *et al*., 2004); contato com terra na prática da jardinagem ou da agricultura (Spalding *et al*., 2003; Cook *et al*., 2000; Avelino *et al*., 2004); ingestão de vegetais e/ou frutas cruas mal higienizadas (Kapperud *et al*., 1996; Baril *et al*., 1999; Avelino *et al*., 2004); consumo de água não tratada (Bahia-Oliveira *et al*., 2003); baixo nível de escolaridade materna (Varella *et al*., 2003; Avelino *et al*., 2004); gestação (Avelino *et al*., 2003); baixo nível socioeconômico (Bahia-Oliveira *et al*., 2003; Segundo *et al*., 2004; Avelino *et al*., 2004). Alguns fatores foram associados com menor ocorrência da infecção: não consumir carne; receber orientações para prevenção da toxoplasmose (Baril *et al*., 1999); morar em regiões de clima rigoroso (Remington *et al*., 2011). A transmissão da infecção pelo leite humano não foi descrita, mas pode ocorrer pelo consumo de leite de cabra não pasteurizado (Remington *et al*., 2011). A pasteurização destrói todas as formas do parasita. Os oocistos podem ser

transportados por invertebrados coprófagos (baratas e moscas), que contaminam a água e os alimentos (Remington *et al*., 2011). Para mais informações sobre a epidemiologia da toxoplasmose, consultar o capítulo 8.

Tabela 1 – Prevalência de soropositividade para toxoplasmose em gestantes ou mulheres em idade reprodutiva no Brasil

Local	Prevalência (%)	Tamanho da amostra	Delineamento do estudo	Referência
São Paulo/SP	67,3	481	Transversal	Vaz *et al.*, 1990
São Paulo/SP	68,8	1.286	Retrospectivo	Guimarães *et al.*, 1993
Fortaleza/CE	71,5	185	Transversal	Rey & Ramalho, 1999
Londrina/PR	67,0	1.559	Retrospectivo	Reiche *et al.*, 2000
Belém/PA	80,8	689	Prospectivo	Bichara, 2001
Alto Uruguai/RS	74,5	2.126	Prospectivo	Spalding *et al.*, 2003
Porto Alegre/RS	59,8	1.261	Transversal	Varella *et al.*, 2003
Goiânia/GO	65,8	2.563	Prospectivo	Avelino *et al.*, 2003
Campinas/SP	56,1	2.199	Transversal	Stella, 2004
Cuiabá/MT	70,7	205	Transversal	Leão, Meirelles Filho & Medeiros, 2004
Uberlândia/MG	51,5	805	Transversal	Segundo *et al.*, 2004
Mato Grosso do Sul	92,0	32.512	Prospectivo	Figueiró-Filho, 2005
Porto Alegre/RS	61,1	10.468	Prospectivo	Reis, Tessaro & d'Azevedo, 2006
Belo Horizonte/MG	57,8	420	Transversal	Carellos, Andrade & Aguiar, 2008

A gravidez, em particular, por ser um período de maior vulnerabilidade imunológica e hormonal, pode ser um fator de risco para aquisição da infecção, principalmente quando associada à baixa renda, ambiente favorável à transmissão e baixa idade da gestante (Avelino *et al*., 2003). Gestantes bem orientadas em relação aos fatores de risco para infecção por *T. gondii* apresentam menor chance de infecção. Mas, para que ocorra adesão, as medidas educativas devem estar ligadas à realidade dos indivíduos (Kapperud *et al*., 1996; Cook *et al*., 2000).

Risco de Transmissão Vertical da Toxoplasmose

A transmissão da toxoplasmose da mãe para o filho (transmissão vertical) ocorre por via hematogênica, sendo a infecção placentária etapa obrigatória. Após a infecção da placenta, ocorre um intervalo de dias a semanas até a infecção fetal. A duração desse período não é completamente conhecida e estima-se que seja mais longo no início da gravidez do que no final. A infecção fetal é mais comum na fase aguda da infecção materna, devido à maior parasitemia. No entanto, após essa fase podem persistir focos de parasita na placenta, que podem ser liberados na circulação fetal em fase tardia da infecção materna. Este é o conceito que justifica a manutenção do tratamento durante toda a gestação, mesmo quando o feto não está infectado (Remington *et al*., 2011). O risco de infecção por *T. gondii* durante a gravidez depende da prevalência da infecção em uma determinada população (circulação do parasita no meio) e do número de mulheres suscetíveis em idade reprodutiva na mesma população. Se o número de mulheres suscetíveis for grande, mas a circulação do parasita pequena, o risco de infecção gestacional é pequeno; ao contrário, se a população de suscetíveis for pequena, mas a circulação do parasita grande, o risco de infecção é

grande. Considera-se que as prevalências médias, entre 25% e 80%, são as que potencialmente trazem maior risco de toxoplasmose congênita (Dubey *et al.*, 2012). O risco de infecção aguda na gestante suscetível oscila entre 0,6% e 1,5%. Em Goiânia, no Brasil, por exemplo, foi observado um risco de 8,6% (Avelino *et al.*, 2004).

A gestante com toxoplasmose aguda (primoinfecção) apresenta risco variável de transmissão vertical da infecção. Esse risco independe da presença de sinais/sintomas maternos e depende, principalmente, da idade gestacional em que ocorreu a infecção. O risco de infecção fetal foi estimado em cerca de 40% na década de 1970 e, mais recentemente, em 29%, sendo de 2% nas oito primeiras semanas, 6% até 13 semanas, 72% até 36 semanas e 81% quando a infecção primária ocorre após a 36ª semana de gestação, período em que a placenta está bem desenvolvida e com melhor irrigação sanguínea (Dunn *et al.*, 1999).

Nas mulheres imunocompetentes, apenas a primoinfecção durante a gestação constitui risco significativo de infecção do feto, embora já tenham sido relatados raros casos de transmissão materno-fetal nessas gestantes com infecção crônica (Andrade *et al.*, 2010). Por isso, Couvreur recomenda, empiricamente, aguardar seis meses após a infecção aguda antes de engravidar e Desmonts recomenda tratar aqueles casos de infecção periconcepcional como infecção aguda na gestação (Remington *et al.*, 2011). Pode ocorrer reinfecção em humanos (Elbez-Rubinstein *et al.*, 2009), mas seu impacto na infecção congênita é desconhecido. Até o momento, a reinfecção está bem documentada em animais.

Risco de Comprometimento do Feto

O risco de comprometimento do feto apresenta relação inversa com a idade gestacional da infecção materna. A infecção fetal é incomum nas infecções maternas ocorridas no primeiro trimestre de gravidez, mas, se infectada, a criança geralmente apresenta comprometimento importante. Ocorre o inverso na infecção materna no último trimestre de gestação, quando o risco de transmissão materno-fetal é elevado, mas a criança geralmente nasce assintomática. Avaliou-se o risco de desenvolvimento de sequelas (retinocoroidite, calcificação craniana isolada e/ou hidrocefalia) na criança com toxoplasmose congênita até os três anos de idade e estimou-se um risco de 61% quando a infecção ocorreu até a 13ª semana, 25% na 26ª semana e 9% na 36ª semana. Após a 36ª semana o risco ainda foi de 6%. Por esses resultados os pesquisadores puderam estimar o risco de comprometimento da criança antes de decidir sobre medidas invasivas de diagnóstico fetal. Multiplicando-se o risco de infecção fetal pelo risco de desenvolvimento de sequelas na criança obteve-se uma taxa de risco variável, que foi maior nas infecções adquiridas entre a 12ª e a 24ª semana de gestação (Dunn *et al.*, 1999). Isso porque o risco de transmissão da infecção para o feto é pequeno no início da gestação e o risco de sequelas graves na criança é pequeno nas infecções adquiridas no final da gestação. Entretanto, observa-se que o risco de retinocoroidite não é influenciado pela idade gestacional em que ocorreu a infecção materna, podendo haver lesão ocular grave nas infecções adquiridas no final da gestação.

Prevalência da Toxoplasmose Congênita

A prevalência da toxoplasmose congênita é baixa, menor que 1/10.000 nascidos vivos, na região norte da Europa e nos Estados Unidos e elevada (1/1.000) na França (Gilbert *et al.*, 2009). No Brasil, estudos recentes em nascidos vivos têm mostrado prevalências de 3-20/10.000 (Camargo Neto, Amorim & Lago, 2010; Lago *et al.*, 2007; Carvalheiro *et al.*, 2005; Andrade, 2008; Bahia-Oliveira *et al.*, 2001; Bichara *et al.*, 2012). As divergências observadas nessas taxas são decorrentes, muitas vezes, de metodologias de pesquisa diferentes, que se baseiam na triagem pré-natal ou de pacientes provenientes de serviços especializados para gestantes de alto risco e, mais recentemente, pela triagem neonatal. Os estudos de triagem neonatal subestimam a real prevalência por desconsiderar abortos, natimortos e neomortos e por utilizar o teste de IgM anti-*T. gondii* como forma de identificar os casos. O teste de

IgM pode ser negativo quando as crianças são infectadas no primeiro trimestre de gestação e não apresentam o anticorpo ao nascimento. Apesar dessas limitações, a triagem neonatal é útil para avaliar o impacto da infecção na população por trabalhar com grandes amostragens.

Na Tabela 2 observam-se os resultados de alguns estudos de prevalência brasileiros que utilizaram a pesquisa de IgM específica no período neonatal. Dois estudos pesquisaram a IgM em sangue de cordão e selecionaram a amostra em hospitais de referência na região (Segundo *et al*., 2004; Mozzatto & Procianoy, 2003). Os outros estudos listados testaram a IgM em sangue seco do recém-nascido.

Tabela 2 – Prevalência da toxoplasmose congênita avaliada pela presença de IgM anti-*Toxoplasma gondii* no período neonatal

Local do estudo	Prevalência por 10.000 nascidos vivos	Amostra	Casos	Material examinado	Referência (Autor)
Campos dos Goytacazes/RJ	20	2.550	55	Sangue periférico – papel-filtro	Bahia-Oliveira *et al.*, 2001
Alto Uruguai/RS	14	2.126	33	Sangue periférico	Spalding *et al.*, 2003
Passo Fundo/RS	8	1.250	11	Sangue de cordão	Mozzatto & Procianoy, 2003
Uberlândia/MG	49	805	44	Sangue de cordão	Segundo *et al.*, 2004
Brasil (vários estados)	5	364.130	1.195	Sangue periférico – papel-filtro	Camargo Neto *et al.*, 2004
Ribeirão Preto/SP	3	15.162	55	Sangue periférico – papel-filtro	Carvalheiro *et al.*, 2005
Porto Alegre/RS	6	10.000	66	Sangue periférico – papel-filtro	Lago *et al.*, 2007
Minas Gerais	13	146.307	1.190	Sangue periférico – papel-filtro	Vasconcelos-Santos *et al.*, 2009
Belém/PA	10	1.000	1	Sangue periférico – papel-filtro	Bichara *et al.*, 2012

PATOGENIA

Na infecção adquirida, após ingestão do parasita ocorre invasão das células do tubo digestivo ou o parasita é fagocitado por leucócitos. Essa invasão é seguida de multiplicação intracelular, lise celular e disseminação do toxoplasma por via hematogênica (para o fígado, pulmões, cérebro e outros órgãos e tecidos) ou linfática (para linfonodos regionais). Todas as células nucleadas do hospedeiro podem ser infectadas, e o prognóstico dessa infecção vai depender, entre outros fatores, da integridade imunológica do indivíduo e da natureza genética do hospedeiro e do parasita. Desconhece-se a maior parte dos eventos moleculares e celulares envolvidos na patogênese da toxoplasmose, mas sabe-se que o equilíbrio entre as respostas pró-inflamatória (Th1) e anti-inflamatória (Th2) determina a presença ou não de manifestações clínicas. O indivíduo que consegue manter o equilíbrio da resposta imune controla a infecção e permanece assintomático. O desequilíbrio dessa resposta pode levar a uma proliferação intensa de taquizoítas, disseminação da infecção e morte do hospedeiro (Pfaff *et al.*, 2007; Roberts *et al.*, 2007; Remington *et al*., 2011).

A infecção fetal após infecção aguda da gestante tem sido atribuída à interação de vários fatores, como estágio de desenvolvimento da placenta, virulência da cepa de *T. gondii*, genótipo e estado imune do hospedeiro e carga tecidual parasitária.

Em relação às cepas de *T. gondii,* quando se comparam as do tipo II, predominantes na Europa, com as que predominam no Brasil (tipos I e III ou recombinantes), observa-se maior virulência nas cepas brasileiras, que

apresentam maior taxa de crescimento, habilidade para penetrar nos tecidos do hospedeiro e capacidade de regular a interleucina 12 (IL-12) (Grigg *et al*., 2001).

A competência imunológica do hospedeiro é fundamental para o controle da infecção. O desenvolvimento da imunidade celular e humoral específicas interrompe a destruição celular causada pelo parasita. Indivíduos imunodeficientes apresentam risco elevado de encefalite, toxoplasmose disseminada e óbito. A primeira resposta desencadeada pelo parasita ao invadir o hospedeiro é a imunidade inata, caracterizada pela fagocitose, citotoxicidade celular e produção de interferon gama (IFN-γ), com ativação de macrófagos e células *natural killer* (NK). Em seguida os macrófagos e células dendríticas apresentam os antígenos para os linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$, induzindo um fenótipo Th1 pela secreção de IL-12. O interferon gama induz a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e de óxido nítrico (NO) por macrófagos ativados, o que inibe a replicação do toxoplasma. A IL-12 atua pela indução da resposta imunocelular forte e efetiva contra os taquizoítas. Se a primoinfecção ocorre em um ambiente Th2 (anti-inflamatório), não ocorre bloqueio da replicação do parasita, o que pode levar a maior necrose tecidual. As interleucinas (IL) chaves contra a replicação do parasita são: IL-12, IFN-γ e FNT-α. Após o controle dos parasitas, a interleucina-10 (IL-10), o fator de crescimento transformante beta (TGF-β), os linfócitos T reguladores e as células dendríticas modulam a forte resposta pró-inflamatória Th1, que, descontrolada, pode matar o hospedeiro. Esse modelo, experimental, pode não se aplicar completamente ao ser humano. Observa-se necrose e resposta inflamatória mais ou menos intensa na dependência dessa resposta imune. O controle da infecção se dá em uma ou duas semanas, com o desenvolvimento da imunidade humoral e celular e o desaparecimento dos taquizoítas dos tecidos. No interior das células permanecem os bradizoítas, que formam os cistos e podem permanecer nos tecidos do hospedeiro por toda a vida. A imunidade adquirida a *T. gondii* está associada a uma resposta do tipo Th1 (Pfaff *et al.*, 2007; Roberts *et al.*, 2007; Grigg *et al.*, 2001).

Nas crianças com toxoplasmose congênita, alguns autores observaram uma resposta celular diminuída aos antígenos do parasita (Yamamoto *et al*., 2000), enquanto outros encontraram a resposta preservada em crianças com idade inferior a 1 ano (Ciardelli *et al*., 2008). Os resultados divergentes sugerem que a resposta dos linfócitos $CD4^+$ antígeno específico pode estar reduzida ou se desenvolver mais lentamente nas crianças infectadas (Remington *et al*., 2011).

Nas gestantes, a resposta imunológica anti-inflamatória (Th2) é necessária para manutenção da gravidez. A placenta secreta hormônios, citocinas e quimiocinas que garantem a tolerância materna para com o feto e sua participação ativa na regulação da resposta imune sistêmica. O aumento de alguns hormônios na circulação materna (estrógeno, testosterona e progesterona), durante a infecção aguda, influencia a modulação da resposta imune: a progesterona inibe a produção de IL-12, FNT-α e NO pelos macrófagos; ela também aumenta a produção de IL-10, reduz a atividade das células NK, inibe o desenvolvimento da resposta do tipo Th1 e estimula o desenvolvimento de uma resposta Th2. Uma resposta imune materna mais equilibrada leva em conta a dupla ação do IFN-γ (controle da infecção materna e aumento da transmissão da infecção através da placenta) (Pfaff *et al*., 2007) e seu potencial efeito nocivo para o feto. Se a primoinfecção ocorre em um ambiente de citocinas Th2, a replicação do toxoplasma não é interrompida e os problemas clínicos secundários à destruição tissular induzida pelo parasita aumentam. A resposta pró-inflamatória (Th1) intensa, mais comum nas infecções maternas no início da gestação, tem sido associada ao maior comprometimento do feto, que resulta, às vezes, em aborto ou natimortalidade. A resposta anti-inflamatória (Th2), predominante no final da gestação, tem sido associada à maior transmissão vertical e menor comprometimento do feto. O ambiente anti-inflamatório protegeria o feto, evitando os efeitos nocivos da resposta imune inflamatória, mas, ao mesmo tempo, aumentaria o risco de transmissão, pela ação do IFN-γ (Roberts *et al*., 2007).

A primoinfecção da gestante é seguida de placentite por disseminação hematogênica e risco de infecção fetal. Na placenta, grupos de taquizoítas podem ser identificados na placa coriônica, na decídua, no âmnio e nas vilosidades.

A partir da placenta, os taquizoítas podem ser transmitidos ao feto via cordão umbilical, disseminando-se por via hematogênica. A placenta constitui uma barreira eficaz contra a infecção do feto, e poucos patógenos, entre os quais *T. gondii,* têm habilidade para atravessá-la. Ainda que a infecção aguda desencadeie resposta imunitária com posterior resistência à infecção, a imunidade associada à infecção crônica ou latente nem sempre é absoluta, e a reinfecção tem sido observada em animais de experimentação e relatada eventualmente em humanos.

A persistência do parasita nos cistos tissulares pode causar doença recrudescente em indivíduos previamente imunocompetentes que se tornam imunodeficientes e em crianças com infecção congênita, que podem desenvolver retinocoroidites ou reativar lesões oculares prévias. A ruptura dos cistos, com proliferação de taquizoítas em tecidos com facilidade de regeneração (fígado, tecido linfoide) ou com boa reserva funcional das células remanescentes (miocárdio e cérebro), pode não se acompanhar de sintomas. Entretanto, a ruptura de cistos na retina geralmente é acompanhada de sintomas, em virtude da concentração da função visual em pequena área da retina. Como no cérebro e no bulbo ocular existe barreira à difusão passiva dos anticorpos, verifica-se proliferação contínua do parasita nesses tecidos (no cérebro, a multiplicação ocorre dentro dos astrócitos), com infecção latente, ao passo que ela tende a desaparecer dos tecidos extraneurais. No cérebro e na retina, além da destruição tissular, pode ocorrer reação de hipersensibilidade, resultante da ruptura dos cistos com liberação de parasitas e fluidos dos cistos. Tem sido observada, em estudos experimentais, supressão significativa da resposta humoral contra os taquizoítas, quando o anticorpo passivo (IgG) está presente, mesmo em baixa concentração, com consequente retardo na formação de IgM. Essa 'tolerância imunológica' tem sido observada na criança com toxoplasmose congênita e atribuída à presença da IgG materna, que inibiria a resposta humoral no feto (Remington *et al.*, 2011). Essa tolerância imunológica induzida em recém-nascidos pelos anticorpos maternos poderia contribuir para a contínua multiplicação de *T. gondii*, com formação de inúmeros cistos na retina e em outros tecidos. Quando, ao longo da vida do indivíduo, os cistos são rompidos, a retinocoroidite se manifesta, com prejuízo da visão. Outros fatores, ainda em estudo, podem estar envolvidos nas recorrências.

PATOLOGIA

Os achados patológicos associados a *T. gondii* estão relacionados ao grau de destruição causada pelo parasita nas células do hospedeiro. O parasita pode ser encontrado em vários órgãos como coração, pulmões, músculo estriado, fígado, baço, rins, suprarrenais, pâncreas, tireoide, testículos, ovários, ouvido, entre outros. Nesses locais podem ser identificados fenômenos inflamatórios e áreas de necrose. Nos rins tem sido descrito quadro de glomerulonefrite e de síndrome nefrótica. Mas, na infecção congênita, os locais frequentemente envolvidos, com intenso comprometimento e graves sequelas da doença, são a retina e o sistema nervoso central.

Pode ocorrer meningoencefalite difusa, caracterizada por lesões inflamatórias, áreas de necrose, calcificação e formação de cistos. Os locais mais envolvidos são o córtex, a substância branca subcortical, os núcleos caudado e lenticular, a região média do cérebro, a ponte e a medula. O processo é muito intenso em torno das arteríolas, vênulas e capilares. Pode ocorrer completa obliteração dos sulcos e giros, e a linha de demarcação entre a aracnoide e a massa cerebral tende a desaparecer. Os parasitas são comumente encontrados nas células das íntimas das arteríolas, vênulas e capilares. Observa-se vasculite em torno do aqueduto de Sylvius e dos ventrículos. Pode ocorrer hidrocefalia, em decorrência da oclusão do forame de Monro e do aqueduto, e calcificação do tecido cerebral necrosado, visível nos exames radiológicos do crânio. Além dos fenômenos oclusivos, a hidrocefalia também pode decorrer da destruição do tecido cerebral, especialmente de necrose periventricular causando ependimite. A necrose e a inflamação do hipotálamo, circundando o terceiro ventrículo, podem explicar a labilidade térmica encontrada em crianças com toxoplasmose

congênita. A extensa necrose do tecido cerebral pode resultar em microcefalia. Nas crianças coinfectadas por HIV e *T. gondii*, observa-se encefalite necrosante na doença aguda e na recorrente.

A retinocoroidite, com suas áreas de necrose e edema da retina, é a lesão mais importante no bulbo ocular. São ainda observadas desestruturação do epitélio pigmentoso da retina e infiltrado inflamatório da retina e da coroide. O infiltrado é formado por linfócitos, plasmócitos e fagócitos mononucleares, e numerosos cistos podem ser encontrados na retina, enquanto o achado de formas livres de toxoplasma é excepcional. A coroidite granulomatosa é secundária à retinite. O processo envolve quase exclusivamente a câmara posterior, mas a retinocoroidite pode ser acompanhada por iridociclite, glaucoma e/ou catarata. Pode ocorrer considerável necrose e destruição ocular, que no feto podem levar à microftalmia resultante da atrofia central da retina e da coroide. O quadro cicatricial da retinocoroidite é caracterizado por áreas de gliose com margens hiperpigmentadas (Mets *et al.*, 1997).

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

Existem algumas controvérsias em relação à frequência das manifestações clínicas da toxoplasmose congênita, especialmente por quatro fatores: as principais referências são da época pré-tratamento; há divergência de termos entre idiomas; há diferenças nas manifestações relatadas na literatura segundo a forma de identificação dos casos (triagem pré-natal ou neonatal, casos identificados clinicamente); e há variabilidade na prevalência e na intensidade de manifestações clínicas entre crianças de diferentes regiões do planeta.

Logo ao nascer, menos de 10% dos recém-nascidos com toxoplasmose congênita apresentam anormalidades ao exame físico. Destes, cerca de um terço mostra um quadro clínico generalizado, comum a outras infecções congênitas, que inclui hepatomegalia, esplenomegalia, icterícia, lesões purpúricas, síndrome nefrótica e outras alterações sistêmicas, associadas, na grande maioria dos casos, a anormalidades neurológicas e oculares típicas. Em dois terços dos bebês sintomáticos, as alterações ao exame físico são localizadas no sistema nervoso central e nos olhos, com microcefalia ou hidrocefalia, convulsões, microftalmia, catarata. As investigações complementares em ambos os grupos quase sempre mostram calcificações cerebrais, alterações liquóricas e anormalidades ao exame oftalmológico, principalmente retinocoroidite, podendo ocorrer também opacidades vítreas, atrofia do nervo óptico e outras. Quando não eram tratados, quase todos os pacientes sintomáticos no período neonatal evoluíam para retardo mental e perda visual. A deficiência auditiva era descrita como frequente, sendo atualmente rara, mas ainda pode ser detectada, principalmente nas crianças cujo tratamento não foi precoce e completo (McLeod *et al.*, 2006; Vasconcelos-Santos *et al.*, 2009; Resende *et al.*, 2010; Cortina-Borja *et al.*, 2010).

Mais de 90% dos recém-nascidos infectados por *T. gondii*, portanto, apresentam exame físico normal ao nascimento. Porém, quando submetidos à investigação mais completa, uma grande proporção deles mostra alguma manifestação clínica: retinocoroidite, calcificações cerebrais, dilatação dos ventrículos cerebrais, alterações liquóricas. Já foi abordada neste capítulo a relação da gravidade das manifestações clínicas com a época da infecção materna, mas ressalte-se que os casos muito acometidos clinicamente são vistos quando a contaminação materno-fetal por *T. gondii* ocorreu até o segundo trimestre da gestação (Dunn *et al.*, 1999).

A proporção de recém-nascidos com exame físico normal que apresentam manifestações clínicas à investigação complementar varia entre os dados da literatura estrangeira (40%) e os estudos feitos no Brasil (60%-80%). Prevalência e gravidade das manifestações oculares também variam conforme a região. Por exemplo, numa comparação entre crianças com toxoplasmose congênita do Brasil e da Europa, as brasileiras apresentam retinocoroidite mais frequentemente, as lesões são mais numerosas e mais graves e ocorrem mais reativações (Vasconcelos-Santos *et al.*, 2009; Guerina *et al.*, 1994, Gilbert *et al.*, 2008).

Pacientes com exame físico normal, mas com manifestações clínicas na investigação complementar, são considerados casos sintomáticos, e não subclínicos (por analogia com *symptomatic*, termo utilizado no idioma inglês). Além disso, lactentes que nascem sem sinais ao exame físico podem apresentá-los nas primeiras semanas de vida, sendo frequente o surgimento de esplenomegalia entre 1 e 3 meses de idade. Uma das formas mais comuns de identificação da toxoplasmose congênita em crianças cuja doença não foi detectada no período neonatal é o surgimento de estrabismo, geralmente entre 4 e 6 meses de idade. Uma dilatação do sistema ventricular, presente ao nascimento e somente identificada por exames de imagem (ultrassom ou tomografia computadorizada) pode evoluir para hidrocefalia nas primeiras semanas de vida e ser notada ao exame físico.

A infecção é considerada subclínica quando o paciente não apresenta alterações, nem ao exame físico, nem à investigação diagnóstica (exceto sorologia positiva, seja presença de IgM e/ou IgA específicas logo ao nascer, seja aumento e persistência da IgG específica). Mas mesmo estes, principalmente se não tratados precocemente, poderão desenvolver manifestações oculares e, menos frequentemente, neurológicas, no decorrer de meses ou anos. Na maior parte dos casos de infecção subclínica ou de retinocoroidite isolada, a infecção materna ocorreu nas últimas semanas de gestação, quando o acometimento fetal costuma ser menos intenso. Por outro lado são vistos, embora raramente, quadros graves, fulminantes, de infecção toxoplásmica generalizada, em bebês infectados em final da gestação (Cortina-Borja *et al*., 2010; Remington *et al*., 2011; Dunn *et al*., 1999).

DIAGNÓSTICO

A toxoplasmose adquirida, assim como a congênita, é assintomática em cerca de 80%-90% dos casos, sendo necessário o uso de exames complementares para o diagnóstico da infecção. O parasita pode ser identificado por métodos parasitológicos, mas os métodos sorológicos são os mais utilizados no diagnóstico, por serem sensíveis e específicos, além de acessíveis nos laboratórios de análises clínicas.

Entre os métodos parasitológicos, o isolamento do parasita, em cultura de tecido ou inoculação em animal de experimentação, exige laboratório de maior complexidade e o resultado é demorado, até seis semanas, sendo ocasionalmente realizado com propósito de genotipagem de cepa infectante. Pode-se identificar o parasita em tecido corporal utilizando a imuno-histoquímica (imunoperoxidase). Mas foi a identificação do DNA do parasita pela técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) que trouxe grandes avanços no diagnóstico da toxoplasmose no binômio mãe-filho. Estudos têm mostrado que comparativamente o uso da PCR no líquido amniótico em relação aos demais métodos de investigação da infecção congênita (inoculação em animal, triagem neonatal, PCR em placentas, sorologia por cordocentese) revelou maior sensibilidade e especificidade, 91% e 99,5%, respectivamente (Bessières *et al*., 2009).

Na infecção adquirida ou congênita, dependendo do local de comprometimento do indivíduo infectado, vários espécimes clínicos se prestam para realização da PCR anti-*T. gondii*: liquor, humores aquoso e vítreo, secreção broncoalveolar, líquidos ascítico e pleural, sangue periférico, medula óssea, urina e, principalmente, líquido amniótico. A PCR no líquido amniótico é considerada o método de escolha para diagnóstico da infecção fetal e, dependendo da sequência iniciadora (*primer*) utilizada, a sensibilidade e especificidade são muito altas. Entretanto, pode ocorrer resultado falso negativo e falso positivo com o teste, o primeiro quando a transmissão materno-fetal se dá após a amniocentese, e o segundo quando ocorre contaminação da amostra, situação incomum. Portanto, independentemente do resultado do teste no pré-natal, a criança deve ser acompanhada até que o diagnóstico de infecção congênita seja confirmado ou excluído. Alguns autores já relataram a associação entre a carga parasitária, medida por PCR em tempo real, e o maior comprometimento da criança (Moncada & Montoya, 2012; Ciardelli *et al.*, 2008; Bessières *et al*., 2009).

A coleta do líquido amniótico para o diagnóstico da infecção fetal por PCR está recomendada quando o diagnóstico sorológico for altamente sugestivo de infecção aguda durante a gravidez. O diagnóstico fetal geralmente é indicado em casos de soroconversão comprovada, na evidência de comprometimento fetal por exames de imagem, ou em gestantes imunossuprimidas. Deve ser realizada com mais de 18 semanas de amenorreia e pelo menos quatro semanas após a data presumida da soroconversão (Moncada & Montoya, 2012).

Os testes sorológicos para o diagnóstico da toxoplasmose na gestante baseiam-se na identificação das imunoglobulinas das classes IgG, IgM, IgA e IgE específicas contra *T. gondii*. A presença de IgG específica estabelece o diagnóstico da infecção mas não determina se a infecção é aguda ou crônica, pois esse anticorpo permanece elevado por anos após a infecção aguda e, em títulos baixos, provavelmente por toda a vida. Como a idade gestacional em que ocorreu a infecção materna é uma informação fundamental para determinar o risco de infecção fetal, outros anticorpos, como IgM e IgA, além do teste de avidez de IgG, ajudam a determinar esse momento. A ausência de IgM específica associada a baixos títulos de IgG indica que a infecção ocorreu há mais de seis meses. A presença de IgM específica positiva associada a IgG geralmente indica infecção recente. Entretanto, embora considerando que a IgM é uma proteína de fase aguda e que, na toxoplasmose, alcança seu nível máximo em cerca de um mês após a infecção e desaparece em média entre seis e nove meses, em alguns casos a IgM persiste em títulos baixos por anos. Por isso, na investigação de toxoplasmose na gestante, a presença de IgG e IgM positivas, já na primeira amostra de sangue, indica a necessidade de realizar outros testes, sendo de grande ajuda a realização do teste de avidez de IgG. A presença de anticorpos IgG com alta avidez indica que a infecção ocorreu há pelo menos 12 a 16 semanas. Entretanto, a presença de anticorpos IgG com baixa avidez não assegura que a infecção é recente, pois esses anticorpos podem persistir por mais de um ano após a infecção aguda e sofrer a influência do tratamento da gestante, que pode interferir na maturação da IgG e prolongar a baixa avidez.

Recomenda-se, para as gestantes infectadas na gravidez, a realização periódica de ultrassom obstétrico com o objetivo de identificar no feto alterações indicativas de infecção, como dilatação dos ventrículos laterais do sistema nervoso central e calcificações no cérebro ou em outras vísceras.

Em relação ao recém-nascido, os marcadores de infecção aguda são as imunoglobulinas específicas IgM, IgA e IgE, pois a IgG pode ser transferida, passivamente, através da placenta da mãe para o filho. Portanto, a IgG positiva no neonato pode significar infecção congênita ou simplesmente refletir o perfil imunológico da mãe (Quadro 1). Recentemente, foi desenvolvido um *immunoblot* (2DIB) com melhor sensibilidade para distinguir a IgG específica de origem materna daquela produzida pelo neonato (Moncada & Montoya, 2012).

Confirma-se a toxoplasmose congênita nos recém-nascidos com pelo menos uma das imunoglobulinas – IgM, IgA ou IgE – positivas, sendo as duas primeiras as mais utilizadas na rotina clínica. Podem-se observar crianças infectadas com diferentes perfis de imunoglobulinas específicas: IgM e IgA positivas; IgM positiva e IgA negativa; IgM negativa e IgA positiva; IgM e IgA negativas. Esse último perfil ocorre porque, mesmo quando os dois testes são realizados simultaneamente, a sensibilidade diagnóstica é de 93%, o que significa que pode haver resultado falso negativo em cerca de 10% dos casos. Os métodos de imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio imunoenzimático indireto (EIA) não são adequados para a identificação de IgM, sendo recomendados os ensaios imunoenzimáticos de captura, mais sensíveis. Considerando que durante o primeiro ano de vida a criança elimina progressivamente a IgG recebida passivamente da mãe, a toxoplasmose congênita pode ser confirmada pela persistência da positividade de IgG aos 12 meses de vida. Ao longo desse seguimento, o aumento nos títulos de IgG também indicam que a criança está infectada.

Quadro 1 – Correlação clínico-laboratorial dos perfis sorológicos mais comuns na investigação da toxoplasmose congênita

Perfil sorológico		Possibilidades de interpretação
IgM	IgG	
Não reagente	Não reagente	1. Ausência de infecção congênita por *Toxoplasma gondii*, ou infecção nos últimos dias antes do nascimento. 2. Se há suspeita clínica e/ou indicativos epidemiológicos no pré-natal de toxoplasmose na gravidez, realizar outro exame 7-15 dias depois do parto. 3. Pode colaborar na interpretação dos resultados a realização simultânea das provas sorológicas pareadas do binômio mãe-filho.
Reagente	Não reagente	1. Possibilidade de escape materno de IgM. 2. Se há suspeita clínica e/ou indicativos epidemiológicos no pré-natal de toxoplasmose na gravidez, realizar outro exame 7-15 dias depois do parto;[1] se a IgG for positiva, confirma-se a infecção congênita.
Reagente	Reagente	Infecção congênita por *Toxoplasma gondii*, quando o exame é realizado nos 6 primeiros meses de vida. Pela possibilidade de escape materno de IgM (muito raro), recomenda-se confirmar a presença da IgM com mais de 7 dias de vida.
Não reagente	Reagente[1]	Muitos recém-nascidos com toxoplasmose congênita apresentam IgM específica negativa desde o nascimento e, na maioria, a IgM negativa-se precocemente. Por isso, IgM negativa não afasta a possibilidade da infecção congênita. 1. Se houver infecção congênita por *Toxoplasma gondii*, nos controles subsequentes haverá ascensão dos títulos de IgG, mesmo em crianças assintomáticas. 2. Se não houver infecção congênita por *Toxoplasma gondii* e a IgG for apenas de transmissão passiva, nos controles subsequentes haverá queda gradativa dos títulos de IgG, que desaparecerão até os 12 meses de vida. • É importante avaliar indicativos epidemiológicos do pré-natal e suspeita clínica para a adequada interpretação laboratorial, sobretudo nas crianças assintomáticas. • Recomenda-se investigar os demais agravos infecciosos de transmissão vertical, assim como avaliação oftalmológica e neurológica, mesmo em crianças assintomáticas.

[1] Pode ser realizada a pesquisa de IgA específica, que, se reagente, também define o caso como infecção congênita por *Toxoplasma gondii*. Associar a pesquisa de IgA, pois pode aumentar a sensibilidade do diagnóstico sorológico da toxoplasmose congênita. Em alguns casos em que a IgM é negativa, a IgA pode ser positiva. As mesmas observações se aplicam à possibilidade de escape materno nos primeiros sete dias.

Outros exames complementares devem fazer parte da investigação diagnóstica do recém-nascido com suspeita de infecção congênita: exame de fundo de olho, exames de imagem do sistema nervoso central (ultrassom transfontanela, tomografia computadorizada de crânio), exame do líquido cefalorraquidiano e exame audiológico.

Crianças nascidas de mulheres coinfectadas por HIV e *T. gondii* devem ser investigadas para toxoplasmose congênita por causa do risco de reativação da infecção crônica materna e transmissão vertical.

Em síntese, considera-se como diagnóstico de toxoplasmose congênita, para fins de início do tratamento no lactente, as seguintes situações: testes pós-natais positivos para IgM ou IgA específica (até 6 meses de idade); detecção de *T. gondii* em tecidos ou fluidos corporais por meio da PCR; aumento progressivo dos níveis de IgG específica no lactente; e positividade para IgG específica acompanhada por alguma manifestação clínica característica na criança (retinocoroidite, calcificações cerebrais, hiperproteinorraquia etc.). Para fins de pesquisa, pode-se adicionar à definição de caso a detecção do parasita por inoculação em animais, cultura de células ou métodos imuno-histoquímicos e a persistência de anticorpos IgG específicos além dos 11 meses de idade, sendo este último o critério considerado padrão-ouro para o diagnóstico definitivo da toxoplasmose congênita. A ausência da infecção congênita será definida quando a IgG específica não for detectada após 2 meses de idade na ausência do tratamento antitoxoplasma (os falsos negativos podem ocorrer antes de dois meses se a infecção materna ocorrer próximo ao parto e nas crianças infectadas tratadas com pirimetamina-sulfonamida).

TRATAMENTO DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

O tratamento da toxoplasmose congênita é obrigatório e deve ser mantido durante todo o primeiro ano de vida da criança, seja o quadro sintomático ou não, sob o esquema terapêutico com sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico (Quadro 2). O tratamento específico e prolongado para a toxoplasmose nos recém-nascidos infectados parece reduzir sequelas oculares e neurológicas quando comparados com controles históricos (McAuley, 2008; Mets *et al.*, 1997; McLeod *et al.*, 2009) que não foram submetidos a tratamento.

McLeod e colaboradores (2006) relataram os resultados de um estudo longitudinal com acompanhamento de 120 casos de toxoplasmose congênita entre 1981 e 2004, que receberam durante um ano tratamento com pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico. Observaram que esses pacientes tiveram melhores resultados quanto ao acometimento ocular e neurológico em relação às crianças que não foram tratadas ou que foram tratadas por menor tempo. Nesse estudo realizado em Chicago, nos Estados Unidos, foi feita a estratificação dos casos conforme a gravidade da doença ao nascimento. Entre as crianças do grupo de manifestações leves ou ausentes, não houve recorrência de lesões oculares e 85% delas apresentaram acuidade visual normal. No grupo de crianças classificadas com doença grave, 100% apresentaram audição normal, 80% desenvolveram função motora normal e 64% não apresentaram recorrência de lesões, mas dano visual foi detectado em 85% dos casos.

Portanto, mediante as evidências do estudo de Chicago, além de outros, está recomendado o tratamento da toxoplasmose congênita durante todo o primeiro ano de vida, do seguinte modo: pirimetamina (2 mg/kg em dose de ataque por dois dias, manter depois 1 mg/kg/dia), em dose única diária por seis meses para crianças sintomáticas e por dois meses para aquelas assintomáticas, depois manter três vezes por semana até o fim do tratamento; sulfadiazina (100 mg/kg/dia) em duas doses diárias; e ácido folínico (10-30 mg) três vezes por semana, conforme controles do hemograma. A corticoterapia (prednisona a 1 mg/kg/dia) está indicada na meningoencefalite e na retinocoroidite aguda com comprometimento da mácula e/ou do nervo óptico, até a melhora do quadro. É necessário o acompanhamento clínico e oftalmológico a cada noventa dias até os 18 meses, depois semestral durante toda a fase pré-escolar (Guerina *et al.*, 1994; McAuley, 2008).

As crianças com toxoplasmose congênita sob tratamento devem realizar com regularidade hemograma, pela possibilidade da mielotoxicidade dos medicamentos usados, exames bioquímicos (ureia, creatinina e transaminases) e exames de urina (observar se há cristalúria ou proteinúria relativas ao uso da sulfadiazina).

O hemograma deve ser solicitado uma vez por semana no início do tratamento com especial atenção à contagem de hemácias, leucócitos e plaquetas. O principal efeito a ser monitorizado é a neutropenia. Se a contagem de neutrófilos se mantiver estável nas primeiras semanas, este exame pode ser realizado a cada 15 dias e uma vez ao mês quando a pirimetamina estiver sendo administrada em dias alternados. Se a criança apresentar infecção viral intercorrente, retomar o controle do hemograma com mais frequência.

A contagem de neutrófilos deve ser mantida acima de 1.000/mm^3. Quando estiver entre 500 a 900/mm^3, o ácido folínico passa a ser usado em dose diária ou pode-se optar pelo aumento da dose. Se os neutrófilos evoluírem para menos de 500/mm^3, a pirimetamina deve ser suspensa, mantendo-se o ácido folínico como já recomendado. A pirimetamina será reintroduzida quando a contagem de neutrófilos estiver superior a 1.000/mm^3.

A extrapolação dos resultados sobre efetividade do tratamento de um continente para o outro pode não ser válida, tendo em vista a possibilidade de a farmacodinâmica variar conforme o genótipo do parasita (Khan *et al.*, 2006; Vallochi *et al.*, 2005). Por isso, há mudanças de paradigmas quanto às considerações em relação ao tratamento na gravidez no continente sul-americano, quando pesquisadores internacionais, antes reticentes a este

tratamento, informam que a evidência científica começa a mostrar um importante impacto das lesões oculares que podem variar de acordo com a presença ou ausência de tratamento das mães no decurso da fetopatia toxoplásmica (Gilbert *et al.*, 2008; Gilbert, 2009; Cortina-Borja *et al.*, 2010).

Quadro 2 – Esquemas terapêuticos recomendados ao tratamento da toxoplasmose na gravidez e congênita

Forma clínica	Esquema terapêutico	Tempo de tratamento	Observações
Toxoplasmose na gravidez[1,2]	Na incerteza da infecção fetal, iniciar com espiramicina[1]	Até próximo ao parto	Na certeza da infecção fetal e nas infecções adquiridas no terceiro trimestre, usar a associação sulfadiazina com pirimetamina e ácido folínico[2]
Toxoplasmose congênita[3]	Associação de sulfadiazina com pirimetamina e ácido folínico	Até completar 1 ano de vida	Manter controles necessários (ver texto): hemograma inicialmente semanal, avaliação clínica mensal, exame de fundo de olho, avaliação do desenvolvimento motor, entre outros

[1] Espiramicina, 3 g/dia, dois comprimidos de 500 mg a cada oito horas. Em outra apresentação comercial a dose equivalente é de 6-9 milhões de UI/dia: dois comprimidos a cada oito ou 12 horas (cada comprimido contém 1,5 milhão de UI).

[2] Quando ocorre soroconversão após a 18ª semana de gravidez, alguns autores recomendam iniciar o tratamento com a associação de sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico (Moncada & Montoya, 2012).

[3] Sulfadiazina (100 mg/kg/dia fracionada em duas tomadas a cada 12 horas), associada à pirimetamina (1 mg/kg/dia) e ácido folínico (inicialmente 10 mg três vezes por semana). Após os 2-6 meses a pirimetamina passa a ser administrada três vezes por semana.

PROGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

Informações sobre o prognóstico da toxoplasmose congênita, assim como o risco de transmissão materno-fetal da infecção, são especialmente importantes para orientação e aconselhamento dos pais nos casos de diagnóstico da toxoplasmose durante a gestação. Em situação de desconhecimento da infecção fetal, a época de pior prognóstico para ocorrer a infecção materna é o segundo trimestre, porque nessa época já existe um risco grande de ocorrer transmissão vertical (em torno de 40% considerando todo o trimestre) e, ao mesmo tempo, ainda existe um risco considerável de acometimento fetal grave, incluindo manifestações neurológicas (Dunn *et al.*, 1999).

Como visto na seção Risco de Transmissão Vertical da Toxoplasmose, no primeiro trimestre o risco de transmissão materno-fetal de *T. gondii* é bem menor (menos de 10% considerando todo o trimestre e menos de 5% no primeiro mês), o que torna mais provável que o feto não seja contaminado, principalmente se a infecção materna tiver sido diagnosticada precocemente e for tratada de imediato e durante toda a gestação. Na presença de diagnóstico fetal positivo, entretanto, a infecção no primeiro trimestre passa a ter prognóstico mais reservado, pelo fato de o acometimento fetal poder ser mais grave, principalmente com referência ao sistema nervoso central. Nessa situação, o diagnóstico fetal e os exames de imagem (ultrassonografia) são muito importantes, podendo detectar hepatoesplenomegalia, dilatação ventricular, calcificações, atrofia de globo ocular e outras anormalidades, que, se presentes, pioram o prognóstico (Cortina-Borja *et al.*, 2010; Dunn *et al.*, 1999; McAuley *et al.*, 2008; McLeod *et al.*, 2006). A importância de investigar essas alterações foi enfatizada por estudos que mostraram que na toxoplasmose adquirida nos primeiros meses de gestação, mas sem alterações na ultrassonografia fetal, o prognóstico para a criança é muito bom (Berrebi *et al.*, 2007).

Nas infecções adquiridas no terceiro trimestre, o risco de transmissão materno-fetal é altíssimo, motivo pelo qual se recomenda tratamento completo da gestante (preferencialmente com esquema que atravesse a barreira placentária) a partir do diagnóstico da infecção materna, dispensando inclusive o diagnóstico fetal. As manifestações neurológicas costumam ser inexistentes ou leves (geralmente poucas calcificações cerebrais e sem repercussão clínica).

O prognóstico neurológico é muito bom; entretanto, permanece um risco elevado de lesões oculares, incluindo extensa retinocoroidite (Vasconcelos-Santos *et al*., 2009; Dunn *et al*., 1999; McLeod *et al.*, 2006; Moncada & Montoya, 2012).

As manifestações clínicas de pior prognóstico na criança são atrofia do parênquima cerebral (hidranencefalia), hidrocefalia presente ao nascimento, microcefalia, convulsões, alterações motoras muito acentuadas, microftalmia, atrofia óptica e retinocoroidite macular extensa. Em alguns casos, em que lesões neurológicas ou oculares graves e irreversíveis já se tenham instalado ao nascimento, o tratamento específico não é resolutivo, embora seja sempre indicado. Nesses casos, os tratamentos auxiliares tornam-se mais importantes (anticonvulsivantes, nutrição especial etc.) (McLeod *et al*., 2006; Moncada & Montoya, 2012).

Nos últimos anos evidencia-se cada vez mais a importância das diferentes cepas de *T. gondii* na epidemiologia, quadro clínico e prognóstico da toxoplasmose congênita. Entretanto, ainda não há evidências de que o conhecimento da cepa em um determinado caso possa determinar diferença na abordagem diagnóstica e terapêutica. Para todos os casos consideram-se as mesmas indicações de tratamento e acompanhamento, abordadas na seção Tratamento da Toxoplasmose Congênita (Olariu *et al*., 2011).

Alguns pontos devem ser lembrados para que os pais sejam orientados objetivamente, sem exagerado otimismo ou pessimismo:

- o prognóstico da hidrocefalia depende muito do tempo transcorrido do seu início até a colocação de derivação ventricular. Nos casos em que esta é feita em tempo hábil, a criança pode ter um desenvolvimento completamente normal. Deve-se ter um especial cuidado em diferenciar, no exame de imagem, a compressão do parênquima, pelo sistema ventricular muito dilatado, de uma verdadeira hidranencefalia;
- crianças com microcefalia podem evoluir bem e atingir um desenvolvimento razoável, com aquisição de habilidades motoras e de linguagem que garantem uma vida quase normal;
- atraso no desenvolvimento neuropsicomotor do lactente não necessariamente acarreta um grande retardo futuro, e a criança pode adquirir as habilidades de modo paulatino e mais tardiamente;
- crianças com lesões oculares extensas, tratadas corretamente e com assistência oftalmológica continuada, podem surpreender por seu desempenho visual, sendo comum que frequentem classes de aula normais, desde que com atenção especial para com sua capacidade visual.

PREVENÇÃO E CONTROLE DA TOXOPLASMOSE CONGÊNITA

A prevenção da toxoplasmose congênita, ou de suas sequelas, é possível mediante quatro estratégias, que podem ser combinadas: identificar as mulheres suscetíveis e limitar o risco de contaminação durante a gestação (prevenção primária); identificar a toxoplasmose na gestação, evitando ou limitando a transmissão placentária de *T. gondii*, pelo tratamento da gestante (prevenção secundária); sendo detectada a soroconversão materna, realizar diagnóstico fetal e, se positivo, tratar o feto; e identificar, diagnosticar e tratar os recém-nascidos com toxoplasmose congênita, mesmo os assintomáticos, para prevenir sequelas tardias (as duas últimas estratégias denominadas às vezes 'prevenção terciária') (Ambroise-Thomas, 2003).

Prevenção Primária

A redução do risco de contaminação das gestantes é feita por meio de medidas higiênicas educativas, que devem ser aplicadas antes e durante a gestação (Quadro 3). O programa de prevenção primária pode ser adaptado a cada região, considerando hábitos de vida, principais fatores de risco e outras características regionais.

É aconselhável que todas as gestantes, independentemente do seu estado imune, recebam orientações de prevenção primária, pois foram descritos casos raros de toxoplasmose congênita em gestantes imunocompetentes previamente soropositivas para toxoplasmose, levantando a possibilidade de recontaminação, talvez por outra cepa de *T. gondii*. Entretanto, principalmente sob o ponto de vista de saúde pública, o maior risco encontra-se nas gestantes soronegativas (suscetíveis), que devem ser alvo de programas preventivos intensivos. Assim, o ideal é combinar a prevenção primária com a triagem sorológica, que identifica esse grupo. Além disso, o conhecimento sobre a própria suscetibilidade estimula as gestantes a seguir as medidas preventivas recomendadas. Os médicos são a principal fonte de informação e devem ser sensibilizados quanto ao seu papel primordial para que as instruções sejam fornecidas de modo repetido e compreensível durante a gestação (Breugelmans, Naessens & Foulon, 2004; Lago, 2006).

Quadro 3 – Instruções de prevenção da toxoplasmose para gestantes

• Evitar a infecção dos gatos: mantê-los bem alimentados para que, ao caçar, não ingiram sua caça; não alimentá-los com carne crua e evitar que saiam à rua.
• Evitar a maturação dos oocistos, trocando a caixa de excrementos dos gatos diariamente. A gestante não deve realizar essa tarefa.
• Evitar contato com gatos, principalmente filhotes.
• Controlar a presença de roedores no domicílio.
• Evitar manipulação da terra ou usar luvas (p. ex., na horticultura, jardinagem, limpeza de quintal).
• Lavar bem as mãos após manipulação de frutas, verduras e legumes.
• Lavar cuidadosamente frutas, verduras e legumes antes do consumo. Gestantes, de preferência, não devem ingerir alimentos crus.
• Proteger reservatórios de água para uso humano de contaminação por fezes de felídeos.
• Não ingerir e não ter contato com nenhuma fonte de água não tratada (rios, lagos, açudes).
• Não deixar que moscas e baratas entrem em contato com os alimentos.
• Não consumir leite não pasteurizado, principalmente de cabra, ou alimentos feitos com leite não pasteurizado.
• Não consumir ovos crus (maionese, gemada) ou com a gema mole.
• Ingerir a carne somente bem passada (após perder completamente a cor vermelha). Esta recomendação é válida para qualquer tipo de carne, inclusive embutidos.
• Não experimentar carne crua. Usar luvas durante a sua manipulação e cuidar para não passar as mãos na boca e nos olhos.
• Gestantes de preferência não devem consumir embutidos, especialmente artesanais.
• Congelar a carne diminui a infecciosidade dos cistos, mas não garante a erradicação.
• Higienizar bem (com água e sabão) os utensílios utilizados no preparo da carne, antes de usá-los para outros fins.

Triagem Pré-natal

Na rotina da triagem pré-natal, a primeira sorologia para toxoplasmose deve ser realizada antes ou no início da gestação, a não ser que um documento identifique a mulher como previamente imune. Gestantes com evidência sorológica de infecção anterior à gestação não necessitam de controles subsequentes. Pode acontecer que no primeiro exame a presença de IgM específica indique toxoplasmose recente. O diagnóstico da toxoplasmose na gestação já foi abordado na seção Diagnóstico, neste capítulo.

Nas gestantes suscetíveis, a sorologia deve ser repetida periodicamente até o final da gestação, visando detectar uma possível soroconversão, já que a toxoplasmose geralmente passa despercebida clinicamente. Idealmente,

a periodicidade da sorologia deveria ser mensal; entretanto, por motivos econômicos, alguns programas utilizam intervalos de dois ou três meses. A sorologia deve ser repetida no momento do parto nas pacientes previamente soronegativas e nas que não realizaram os testes durante a gestação (Lago *et al*., 2009).

Triagem Neonatal

A triagem neonatal consiste na pesquisa de IgM anti-*T. gondii* junto com os outros testes de rotina. Quando positiva, é feita sorologia confirmatória no recém-nascido e na mãe. A IgM anti-*T. gondii* positiva no teste de triagem neonatal deve ser sempre seguida de investigação completa e acompanhamento do lactente, mesmo com resultado negativo nos testes séricos confirmatórios, pois a IgM pode negativar-se muito precocemente no lactente infectado (muitas vezes antes de um mês e frequentemente antes dos dois meses). Como nem todos os recém-nascidos com toxoplasmose congênita apresentam IgM anti-*T. gondii* positiva, alguns casos podem passar despercebidos pela triagem neonatal (Guerina *et al*., 1994; Vasconcelos-Santos *et al.*, 2009).

Escolha da Estratégia

A prevenção primária deve sempre ser realizada, mas considera-se importante que seja acompanhada por algum tipo de triagem sorológica, ficando a discussão entre a estratégia neonatal ou a pré-natal (Lago, 2006).

Argumentos a favor da triagem neonatal são as controvérsias ainda existentes sobre o tratamento na gestação, o grande número de gestantes suscetíveis em regiões de baixa prevalência, as dificuldades operacionais dos programas pré-natais e a angústia gerada nos pais nos casos de dúvida diagnóstica na gestação. Irrefutáveis evidências da eficácia do tratamento iniciado precocemente nos recém-nascidos também constituem um forte argumento a favor dessa estratégia, que, entretanto, requer um programa bem estruturado, em que não ocorram atrasos na confirmação diagnóstica e no início do tratamento (Guerina *et al*., 1994; McLeod *et al*., 2009).

Entretanto, em estudos recentes aponta-se cada vez mais para as vantagens da triagem pré-natal, embora questões éticas impeçam ensaios randomizados com grupo-controle sem tratamento. Apesar das dificuldades inerentes aos estudos observacionais, as evidências atuais já são suficientes para defender a importância da estratégia pré-natal, que estimula a prevenção e permite o tratamento precoce dos casos detectados ainda na fase intrauterina, com melhora do prognóstico (Cortina-Borja *et al*., 2010; McLeod *et al*., 2009; Thulliez, 2001).

A escolha da estratégia é influenciada também pela prevalência da toxoplasmose na população. Em regiões onde a prevalência é baixa, a triagem pré-natal torna-se mais onerosa pela alta proporção de gestantes suscetíveis que precisam repetir a sorologia várias vezes, apesar de terem menos chance de se contaminar. Porém, levando em conta a alta morbidade da toxoplasmose congênita, a triagem pré-natal pode ser custo-efetiva mesmo nessas regiões. Quando a prevalência é alta, a triagem pré-natal tem uma melhor relação custo-benefício, como no Brasil, onde em média 70% das mulheres em idade fértil já são imunes e apenas 30% necessitam repetir os testes no decorrer da gestação. Além disso, pela forte contaminação do ambiente, as gestantes suscetíveis têm alto risco de adquirir a toxoplasmose. Estudos de custo-benefício não podem ser generalizados, pois cada área geográfica tem peculiaridades que influem no resultado e indicam diferentes algoritmos, havendo necessidade de pesquisas que levem em conta essas diferenças. Por outro lado, esses estudos não incluem os custos intangíveis de prevenir mortes neonatais ou deficiências, sendo importante não subestimar os custos humanos de um dano que poderia ser minimizado ou mesmo evitado (McLeod *et al*., 2009; Thulliez, 2001; Stillwaggon *et al*., 2011)

REFERÊNCIAS

AMBROISE-THOMAS, P. Toxoplasmose congénitale: les différentes stratégies préventives. *Archives of Pediatrics*, 10: 12-14, 2003.

ANDRADE, G. M. Q. *Triagem neonatal como estratégia para o diagnóstico e tratamento precoces da toxoplasmose congênita em Belo Horizonte, Minas Gerais*, 2008. Tese de Doutorado, Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais.

ANDRADE, G. M. *et al*. Congenital toxoplasmosis from a chronically infected woman with reactivation of retinochoroiditis during pregnancy. *Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro)*, 86(1): 85-88, 2010.

AVELINO, M. M. *et al*. Pregnancy as a risk factor for acute toxoplasmosis seroconversion. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 108(1): 19-24, 2003.

AVELINO, M. M. *et al*. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in women of childbearing age. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 8(2): 164-174, 2004.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. *et al*. Toxoplasmosis in Southeastern Brazil: an alarming situation of highly endemic acquired and congenital infection. *International Journal for Parasitology*, 31: 133-137, 2001.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. *et al*. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state. *Emerging Infectious Diseases*, 9(1): 55-62, 2003.

BARIL, L. *et al*. Risk factors for toxoplasma infection in pregnancy: a case-control study in France. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 31(3): 305-309, 1999.

BERREBI, A. *et al*. Outcome for children infected with congenital toxoplasmosis in the first trimester and with normal ultrasound findings: a study of 36 cases. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 135(1): 53-57, 2007.

BESSIÈRES, M. H. *et al*. Diagnosis of congenital toxoplasmosis: prenatal and neonatal evaluation of methods used in Toulouse University Hospital and incidence of congenital toxoplasmosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(2): 389-392, 2009.

BICHARA, C. N. C. *Perfil soroepidemiológico da toxoplasmose humana na área metropolitana de Belém/PA: a experiência do Serviço de Parasitologia do Instituto Evandro Chagas*, 2001. Dissertação de Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, Belém: Universidade Federal do Pará.

BICHARA, C. N. C. *et al*. Incidence of congenital toxoplasmosis in the city of Belém, state of Pará, northern Brazil, determined by a neonatal screening program: preliminary results. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45(1): 122-124, 2012.

BREUGELMANS, M.; NAESSENS, A. & FOULON, W. Prevention of toxoplasmosis during pregnancy – an epidemiologic survey over 22 consecutive years. *Journal of Perinatal Medicine*, 32: 211-214, 2004.

CAMARGO NETO, E.; AMORIM, F. & LAGO, E. G. Estimation of the regional distribution of congenital toxoplasmosis in Brazil from the results of neonatal screening. *Scientia Medica (Porto Alegre)*, 20(1): 64-70, 2010.

CAMARGO NETO, E. *et al*. Newborn screening for congenital infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*, 10: 1.069-1.073, 2004.

CARELLOS, E. V. M.; ANDRADE, G. M. Q. & AGUIAR, R. A. L. P. Avaliação da aplicação do protocolo de triagem pré-natal para toxoplasmose em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: estudo transversal em puérperas de duas maternidades. *Cadernos de Saúde Pública*, 24(2): 391-401, 2008.

CARVALHEIRO, C. G. *et al*. Incidence of congenital toxoplasmosis estimated by neonatal screening: relevance of diagnostic confirmation in asymptomatic newborn infants. *Epidemiology and Infection*, 133(3): 485-491, 2005.

CIARDELLI, L. *et al*. Early and accurate diagnosis of congenital toxoplasmosis. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 27(2): 125-129, 2008.

COOK, A. J. C. *et al*. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *BMJ*, 321(7.254):142-147, 2000.

CORTINA-BORJA, M. *et al*. Prenatal treatment for serious neurological sequelae of congenital toxoplasmosis: an observational prospective cohort study. *PLoS Medicine*, 7(10): e1.000.351, 2010.

DUBEY, J. P. *et al.* Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology*, 139: 1.375-1.424, 2012.

DUNN, D. *et al*. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *The Lancet*, 353: 1.829-1.833, 1999.

ELBEZ-RUBINSTEIN, A. *et al*. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(2): 280-285, 2009.

FIGUEIRÓ-FILHO, E. A. *et al*. Toxoplasmose aguda: estudo da frequência, taxa de transmissão vertical e relação entre os testes diagnósticos materno-fetais em gestantes em estado da região Centro-Oeste do Brasil. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 27: 442-449, 2005.

GILBERT, R. Treatment for congenital toxoplasmosis: finding out what works. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(2): 305-311, 2009.

GILBERT, R. E. *et al*. The European Multicentre Study on Congenital Toxoplasmosis (EMSCOT). Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(8): e277, 2008.

GILOT-FROMONT E. *et al.* The life cycle of *Toxoplasma gondii* in the natural environment. *In*: DJURKOVIĆ-DJAKOVIĆ, O. (Ed.). *Toxoplasmosis – Recent Advances*. Rijeka: InTech, 2012.

GRIGG, M. E. *et al*. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 184: 633-639, 2001.

GUERINA, N. G. *et al*. Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. *The New England Journal of Medicine*, 330: 1.858-1.863, 1994.

GUIMARÃES, A. C. S. *et al*. Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in the São Paulo Metropolitan region. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 35(6): 479-483, 1993.

KAPPERUD, G. *et al*. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: results of a prospective case-control study in Norway. *American Journal of Epidemiology*, 144(4): 405-412, 1996.

KHAN, A. *et al*. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 12(6): 942-949, 2006.

LAGO, E. G. *Estratégias de controle da toxoplasmose congênita*, 2006. Tese de Doutorado, Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

LAGO, E. G. *et al*. Congenital toxoplasmosis: late pregnancy infections detected by neonatal screening and maternal serological testing at delivery. *Pediatric and Perinatal Epidemiology*, 21(6): 525-531, 2007.

LAGO, E. G. *et al*. Screening for *Toxoplasma gondii* antibodies in 2,513 consecutive parturient women and evaluation of newborn infants at risk for congenital toxoplasmosis. *Scientia Medica*, 19(1): 27-34, 2009.

LEÃO, P. R. D.; MEIRELLES FILHO, J. & MEDEIROS, S. F. Toxoplasmose: soroprevalência em puérperas atendidas pelo Sistema Único de Saúde. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 26: 627-632, 2004.

McAULEY, J. B. Toxoplasmosis in children. *The Pediatric Infectious Diseases Journal*, 27(2): 161-162, 2008.

McLEOD, R. *et al*. Toxoplasmosis study group. Outcome of treatment for congenital toxoplasmosis, 1981-2004: the National Collaborative Chicago-Based, congenital toxoplasmosis study. *Clinical Infectious Diseases*, 42(10): 1.383-1.394, 2006.

McLEOD, R. *et al*. Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(2): 320-344, 2009.

METS, M. B. *et al*. Eye manifestations of congenital toxoplasmosis. *American Journal of Ophthalmology*, 123(1): 1-16, 1997.

MONCADA, P. A. & MONTOYA, J. G. Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence, diagnosis and treatment. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 10(7): 815-828, 2012.

MOZZATTO, L. & PROCIANOY, R. S. Incidence of congenital toxoplasmosis in southern Brazil: a prospective study. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 45(3): 147-151, 2003.

NOBLE, A. G. *et al.* Chorioretinal lesions in mothers of children with congenital toxoplasmosis in the National Collaborative Chicago-based, Congenital Toxoplasmosis Study. *Scientia Medica*, 20(1): 20-26, 2010.

OLARIU, T. R. *et al*. Severe congenital toxoplasmosis in the United States: clinical and serologic findings in untreated infants. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 30(12): 1.056-1.061, 2011.

PFAFF A. W. *et al*. Cellular and molecular physiopathology of congenital toxoplasmosis: the dual role of IFN-gamma. *Parasitology*, 134(Pt 13): 1895-1902, 2007.

REICHE, E. M. V. *et al*. Prevalência de tripanossomíase americana, sífilis, toxoplasmose, rubéola, hepatite B, hepatite C e da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, avaliada por intermédio de testes sorológicos, em gestantes atendidas no período de 1996 a 1998 no Hospital Universitário Regional Norte do Paraná (Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 33(6): 519-527, 2000.

REIS, M. M.; TESSARO, M. M. & D'AZEVEDO, P. A. Perfil sorológico para toxoplasmose em gestantes de um hospital público de Porto Alegre. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 28(3): 158-164, 2006.

REMINGTON, J. S. *et al*. Toxoplasmosis. *In*: REMINGTON, J. S. *et al*. (Eds.). *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. 7. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2011.

RESENDE, L. M. *et al*. Congenital toxoplasmosis Brazilian group of the Universidade Federal de Minas Gerais (CTBG-UFMG). Congenital toxoplasmosis: auditory and language outcomes in early diagnosed and treated children. *Scientia Medica*, 20(1): 13-19, 2010.

REY, L. C. & RAMALHO, I. L. C. Seroprevalence of toxoplasmosis in Fortaleza, Ceará, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 41(31): 171-174, 1999.

ROBERTS, C. W. *et al*. Adaptive immunity and genetics of the host immune response. *In*: WEISS, L. M. & KIM, K. (Eds.). Toxoplasma gondii*, the Model Apicomplexan: perspectives and methods*. London: Academic Press, Elsevier, 2007.

SEGUNDO, G. R. *et al*. Congenital toxoplasmosis in Uberlandia, MG, Brazil. *Journal of Tropical Pediatrics*, 50(1): 50-53, 2004.

SPALDING, S. M. *et al*. Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de toxoplasmose congênita em município do Rio Grande do Sul. *Revista da Sociedade Brasileria de Medicina Tropical*, 36(4): 483-491, 2003.

STELLA, J. H. *Rastreamento pré-natal para toxoplasmose na rede básica de saúde em Campinas: prevalência dos diferentes perfis sorológicos e comparação da rotina vigente com uma nova proposta*, 2004. Dissertação de Mestrado, Campinas: Universidade Estadual de Campinas.

STILLWAGGON, E. *et al*. Maternal serologic screening to prevent congenital toxoplasmosis: a decision-analytic economic model. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5: e1.333, 2011.

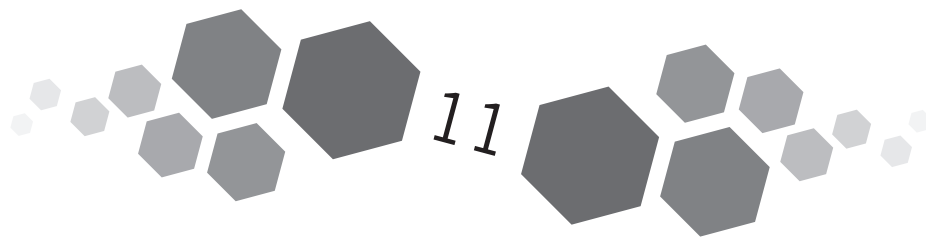
THULLIEZ, P. Efficacy of prenatal treatment for toxoplasmosis: a possibility that cannot be ruled out. *International Journal of Epidemiology*, 30: 1.315-1.316, 2001.

VALLOCHI, A. L. *et al*. The genotype of *Toxoplasma gondii* strains causing ocular toxoplasmosis in humans in Brazil. *American Journal of Ophthalmology*, 139(2): 350-351, 2005.

VARELLA, I. S. *et al*. Prevalência de soropositividade para toxoplasmose em gestantes. *Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro)*, 79(1): 69-74, 2003.

VASCONCELOS-SANTOS, D. V. *et al*. Congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil: results of early ophthalmologic examination of a large cohort of neonates. *Ophthalmology*, 116: 2.199-2.205, 2009.

VAZ, A. J. *et al*. Sorologia positiva para sífilis, toxoplasmose e doença de Chagas em gestantes de primeira consulta em centros de saúde de área metropolitana, Brasil. *Revista de Saúde Pública de São Paulo*, 24: 373-379, 1990.

YAMAMOTO, J. H. *et al*. Discrimination between patients with acquired toxoplasmosis and congenital toxoplasmosis on the basis of the immune response to parasite antigens. *The Journal of Infectious Diseases*, 181: 2.018-2.022, 2000.

Quadro Clínico em Pacientes Imunocompetentes

Guido Carlos Levi

A toxoplasmose adquirida é assintomática na maioria dos casos, isto é, em aproximadamente 80%-90% dos indivíduos imunocompetentes (Remington, 1974). Serão analisadas aqui somente as manifestações clínicas da doença em pacientes com imunidade normal, pois o capítulo 12 é dedicado aos imunocomprometidos, exceto os quadros oculares, que por sua importância também mereceram um capítulo próprio (capítulo 14). O Quadro 1 resume as possíveis manifestações clínicas da toxoplasmose em pacientes imunocompetentes.

Quadro 1 – Formas clínicas de toxoplasmose adquirida em indivíduos imunocompetentes

1. Forma linfoglandular
2. Meningoencefalite
3. Coriorretinite
4. Pneumonite
5. Miocardite
6. Hepatite
7. Miosite
8. Erupção cutânea

Fonte: Amato Neto *et al*., 1995.

FORMA LINFOGLANDULAR

A forma linfoglandular é de longe a mais frequente das formas de toxoplasmose adquirida. Febre, linfadenomegalia, hepatomegalia e esplenomegalia, cefaleia e mialgia são os achados mais comuns, podendo ocorrer também dor de garganta, erupção cutânea e sudorese noturna.

A linfadenopatia é encontrada principalmente na cadeia cervical, em especial a posterior (Jones, Kean & Kimball, 1965a). A frequência de seu achado é variável: 70% para Amato Neto e colaboradores (1995), 59,8% para Silva e colaboradores (2008), 40% para Kean (1972). Os gânglios costumam apresentar consistência normal e ser um pouco dolorosos à palpação. Em geral são móveis, não aderentes aos planos profundos, e não coalescentes, embora ocasionalmente cheguem a formar massas que se assemelham às de processos neoplásicos. Às vezes surgem em localizações não habituais, como a região parotídea, inclusive intraglandulares, levando à confusão diagnóstica com caxumba e tumores de parótida (Ferraz *et al*., 1984; Hadi & Rameh, 2007).

A febre também é achado frequente, embora com encontro variável em estudos diversos: 79% para Amato Neto, Bianchi e Pannuti (1973), 59,8% para Silva e colaboradores (2008) e 40% para Kean (1972). Pode ser bastante elevada, às vezes contínua, às vezes mais vespertina, geralmente com uma a duas semanas de evolução, raramente ultrapassando um mês. É muito comumente acompanhada de cefaleia e mialgia.

Hepatomegalia é encontrada em um terço (Levi & Mendonça, 2003) a dois terços dos casos (Amato Neto, Mazzucato & Asato, 1985), e esplenomegalia em cerca de 40% (Levi & Mendonça, 2003). Como na toxoplasmose adquirida é frequente o encontro de atipias linfocitárias, às vezes em quantidades elevadas, é fácil compreender como a linfadenopatia febril associada aos achados acima descritos leva a uma possível confusão diagnóstica com a mononucleose infecciosa, exigindo diferenciação sorológica.

No diagnóstico diferencial, também se deve atentar para citomegalovirose, tuberculose, doença de arranhadura de gato, sarcoidose, leucemia, linfoma e neoplasias metastáticas (Amato Neto *et al*., 1995). Em 1985, Amato Neto Mazzucato e Asato (1985) chamaram a atenção, pela primeira vez na literatura, para a possível confusão diagnóstica nas fases iniciais da toxoplasmose adquirida linfoglandular com a febre tifoide, pois o hemograma da primeira nesse período pode ser leucopênico, com desvio à esquerda e aneosinofilia, semelhante, portanto, ao da segunda. A diferenciação se tornará mais simples com a evolução clínica e as modificações nas características do hemograma.

A evolução da forma linfoglandular da toxoplasmose adquirida costuma ser benigna e autolimitada. A astenia pode persistir algum tempo, e a linfadenopatia por vários meses.

É preciso chamar a atenção, entretanto, para a possibilidade de formas mais graves, quando poderão estar presentes também manifestações de outras formas clínicas (que veremos a seguir), e para a ocorrência tardia de aparecimento da coriorretinite, como será relatado no capítulo 14 (Toxoplasmose ocular).

MENINGOENCEFALITE

Embora o comprometimento do sistema nervoso central na toxoplasmose seja habitualmente associado a algum tipo de imunodeficiência, em particular Aids, vários casos já foram descritos em indivíduos imunocompetentes. Sabin, em 1941, foi o primeiro a chamar a atenção para essa possibilidade, com suas observações sobre encefalite toxoplásmica em crianças (Sabin, 1941). Em 1975, Townsend e colaboradores (1975), revendo 45 casos publicados de toxoplasmose do sistema nervoso central, verificaram não haver imunodeficiência reconhecível em 22 deles, e destacaram a importância de considerar essa possibilidade diagnóstica por se tratar de patologia com potencial benefício terapêutico. Em 1996, Couvreur e Thulliez (1996) descreveram quatro casos associados a comprometimento ocular.

As principais manifestações clínicas são cefaleia, distúrbios de comportamento e do nível de consciência (Carvalho & Farhat, 1999). Alguns autores chamam a atenção para a possibilidade de ocorrer conjuntamente perda auditiva, que poderia surgir mesmo sem manifestações clínicas de meningoencefalite (Rosch *et al*., 1998; Schlottmann, *et al*.

1996). Outros tipos de comprometimentos neurológicos, como encefalite pura, mielite, paralisia de nervos cranianos e polirradiculoneurite, são bem mais raros, bem como a formação de abscessos cerebrais (Silva *et al*., 2001).

O diagnóstico etiológico pode ser difícil, em virtude da possibilidade de aparecimento tardio dos anticorpos específicos (Hakes & Armstrong, 1983). As alterações liquóricas em geral são caracterizadas por discreto aumento de celularidade, com predomínio de linfomononucleares e hiperproteinorraquia não muito elevada (Amato Neto *et al*., 1995). O achado do toxoplasma no liquor é excepcional em pacientes imunocompetentes. Embora possa vir a representar um útil procedimento diagnóstico, a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) no liquor ainda carece de maior experiência (Savva *et al*., 1990).

PNEUMONITE

Embora possa ser achado radiológico em paciente com a forma linfoglandular aguda, em alguns casos, raros porém não excepcionais, a pneumonite pode ser a manifestação predominante de uma toxoplasmose adquirida em indivíduo imunocompetente.

Já em 1963, Ludlam e Beattie (1963) descreveram nove casos, classificando dois como prováveis e sete como possíveis. Na enfermaria de moléstias infecciosas do Hospital do Servidor Público Estadual Francisco Morato de Oliveira, de São Paulo, foram coletados seis casos com confirmação sorológica indiscutível de infecção aguda em que o quadro pulmonar foi a manifestação central (Amato Neto *et al*., 1995).

O exame radiológico do tórax mostra em geral um comprometimento intersticial dos pulmões, numa minoria dos casos, podendo haver aspecto broncopneumônico, sendo também excepcional o achado de gânglios mediastinais enfartados (Langeron & Routier, 1962).

MIOCARDITE

O acometimento miocárdico é mais comum nas formas disseminadas da doença (Kass *et al*., 1952), porém pode ocorrer, embora excepcionalmente, como manifestação clínica isolada (Montoya *et al*., 1997). A maioria dos casos descritos na literatura teve diagnóstico *post mortem*, pois o quadro clínico não é diferente de outras causas de miocardite. O diagnóstico em vida baseia-se na presença de quadro clínico e eletrocardiográfico de miocardite com sorologia positiva para toxoplasmose aguda e ausência de outras causas de miocardite (Montoya *et al*., 1997). Podem ocorrer arritmias, insuficiência cardíaca e pericardite associada (Jones, Kean & Kimball, 1965b).

É importante a suspeita clínica precoce, pois embora a efetividade da terapêutica antitoxoplásmica na miocardite não tenha avaliações mais extensas, por causa da baixa frequência dos casos, parece que a adição de corticoterapia ao esquema antiparasitário pode ser útil, pelo menos na presença de arritmias e defeitos de condução (Theologides & Kennedy, 1969).

HEPATITE

A existência de um tipo hepático de toxoplasmose adquirida foi proposta pela primeira vez por Kabelitz (1962), em 1962. Em sua descrição de 26 casos, embora em alguns as alterações hepáticas tenham surgido como parte de uma forma linfoglandular da doença, em alguns pacientes o processo hepático foi observado como quadro primário. A seguir, ocorreram poucas descrições de toxoplasmose aguda simulando quadro de hepatite viral, tendo Vischer, Berheim e Engelbrecht (1967), em 1967, publicado dois casos com essas características.

Em nosso meio, Amato Neto e Mendonça (1979) realizaram as mais extensas investigações disponíveis sobre o comprometimento hepático na forma linfoglandular da toxoplasmose adquirida. Além do achado frequente de hepatomegalia (66% dos casos), relataram que os aumentos de transaminasemia são relativamente frequentes (um terço dos casos) e em níveis no máximo moderados. Icterícia nunca esteve presente, e os achados anatomopatológicos sugeriam não haver motivos para evolução hepática desfavorável.

MIOSITE

Embora a toxoplasmose aguda simulando polimiosite seja considerada rara, existem numerosas publicações sobre essa manifestação da doença (Samuels & Rietscheil, 1976). Chegou-se mesmo a suspeitar da toxoplasmose como causa da dermatomiosite (Lapetina, 1989), porém esse nexo etiológico jamais foi comprovado. No entanto, a confusão diagnóstica é compreensível pela possível intensidade de comprometimento de músculos esqueléticos na toxoplasmose aguda, como bem estudado em nosso meio (Mendonça, Amato Neto & Pasternak, 1972; Hallack, 1974), onde o diagnóstico diferencial importante se dá com a leptospirose.

ERUPÇÃO CUTÂNEA

Embora vários tipos de manifestações exantemáticas já tenham sido associados à toxoplasmose aguda, a modalidade maculopapular é seguramente a mais frequente. Tem predomínio torácico e duração variável (Amato Neto, 1970). No entanto, Amato Neto (1970) chama a atenção para o fato de as lesões dermatológicas da toxoplasmose virem em geral associadas a outras manifestações da doença, não sendo possível afirmar se existe processo exantemático puro ou predominante.

Finalmente, cabe destacar a ocorrência de surtos epidêmicos de toxoplasmose adquirida em nosso meio. O capítulo 8, relativo à epidemiologia da doença, analisa essa situação com mais detalhes. Algumas vezes suspeitou-se de provável transmissão alimentar, em outras não foi identificada a provável fonte de contaminação. No entanto, e falando a favor da existência de cepas de *Toxoplasma gondii* com diferentes patogenicidades, as características desses surtos foram bastante diversas. No surto de Serra dos Carajás, no Pará (Hallage *et al.*, 1992), o acometimento pulmonar foi a principal manifestação clínica, estando presente em 68,8% das formas sintomáticas. Já no surto de Itararé (estado de São Paulo), a maioria dos pacientes apresentou quadro clínico exuberante, com grave comprometimento do estado geral, inclusive com quatro internações em UTI com quadro convulsivo, miocardite e insuficiência respiratória (Serviço de Epidemiologia do Instituto de Infectologia Emilio Ribas, 1999). Já nos outros surtos houve basicamente doença febril aguda com predomínio das manifestações linfoglandulares.

REFERÊNCIAS

AMATO NETO, V. Aspectos dermatológicos da toxoplasmose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 4: 345-348, 1970.

AMATO NETO, V.; BIANCHI, A. & PANNUTI, C. S. Resultados da nova prova de dinitroclorobenzeno executada em pacientes com toxoplasmose adquirida, forma linfoglandular. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 15: 94-98, 1973.

AMATO NETO, V.; MAZZUCATO, G. & ASATO, M. S. Semelhança clínico-hematológica inicial da toxoplasmose adquirida, aguda, com febre tifoide. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*; 18: 161-163, 1985.

AMATO NETO, V. *et al*. *Toxoplasmose*. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

CARVALHO, C. M. C. N. & FARHAT, C. K. Toxoplasmose adquirida. *Journal of Pediatrics*, 75, supl. 1: S63-S67, 1999.

COUVREUR, J. & THULLIEZ, P. H. Toxoplasmose acquise à localization oculaire ou neurologique. *Presse Médicale*, 25: 438-442, 1996.

FERRAZ, A. R. *et al*. Tumor de parótida como manifestação inicial de provável toxoplasmose aguda linfoglandular. *Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de S. Paulo*, 39: 239-242, 1984.

HADI, U. & RAMEH, C. Intraglandular toxoplasmosis of the parotid gland pre- or postoperative diagnosis? *American Journal of Otolaryngology*, 28: 201-204, 2007.

HAKES, T. B. & ARMSTRONG, D. Toxoplasmosis; problems in diagnosis and treatment. *Cancer*, 52: 1.535-1.540, 1983.

HALLACK, K. A. Um caso de toxoplasmose de localização muscular. *In*: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, X, 3-6 fev. 1974, Curitiba. *Anais*... Curitiba, 1974.

HALLAGE, N. M. *et al*. Toxoplasmose: ocorrência epidêmica na Serra de Carajás, Pará, Brasil. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE INFECTOLOGIA, VII, 1992, São Paulo. *Anais*... São Paulo, 1992.

JONES, T. C.; KEAN, B. H. & KIMBALL, A. C. Toxoplasmic lymphadenitis. *JAMA*, 196: 1-5, 1965a.

JONES, T.C.; KEAN, B. H. & KIMBALL, A. C. Pericarditis associated with toxoplasmosis: report of a case and review of the literature. *Annals of Internal Medicine*, 62: 786-790, 1965b.

KABELITZ, J. Lebererkrankungen bei post natal erworbener Toxoplasmose. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 74: 310-311, 1962

KASS, E. H. *et al*. Toxoplasmosis in the human adult. *Archives of Internal Medicine*, 89: 759-782, 1952.

KEAN, B. H. Clinical toxoplasmosis – 50 years. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 66: 549-567, 1972.

LANGERON, L. & ROUTIER, G. Toxoplasmose ganglionnaire acquise de l'adulte avec localisation médiastinale. *Journal sciences medicales de Lille*, 80: 329-343, 1962.

LAPETINA, F. Toxoplasmosi e dermatomiosite: nesso causale ou casuale? *Pediatria Medica e Chirurgica*, 11: 197-203, 1989.

LEVI, G. C. & MENDONÇA, J. S. Toxoplasmose. *In*: CIMERMAN, S. & CIMERMAN, B. (Eds.). *Medicina Tropical.* São Paulo: Atheneu, 2003.

LUDLAM, G. B. & BEATTIE, C. D. Pulmonary Toxoplasmosis. *The Lancet*, 2: 1.136-1.138, 1963.

MENDONÇA, J. S.; AMATO NETO, V. & PASTERNAK, J. Toxoplasmose adquirida, modalidade muscular: relato de dois casos. *In*: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, VIII, 6-9 fev. 1972, Belo Horizonte. *Anais*... Belo Horizonte, 1972.

MONTOYA, J. G. Toxoplasmic myocarditis and polymyositis in patients with acute acquired toxoplasmosis diagnosed during life. *Clinical Infectious Diseases*, 24: 676-683, 1997.

PEDRO, R. J.; AMATO NETO, V. & MENDONÇA, J. S. Análise clínico-laboratorial do comprometimento hepático na toxoplasmose adquirida, forma ganglionar. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 21: 125-129, 1979.

REMINGTON, J. S. Toxoplasmosis in the adult. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 50: 211-227, 1974.

ROSCH, D. *et al*. Acquired toxoplasmosis with cerebral involvement and subsequent hearing loss. *Klinische Pädiatrie*, 210: 125-127, 1998.

SABIN, A. B. Toxoplasmic encephalitis in childhood. *Jama*, 116: 806-807, 1941.

SAMUELS, B. S. & RIETSCHEL, R. L. Polymyositis and toxoplasmosis. *Jama*, 235: 60-61, 1976.

SAVVA, D. *et al*. Polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Medical Microbiology*, 32: 25-31, 1990.

SCHLOTTMANN, A. Sudden deafness and increased toxoplamosis IgM titer. *Laryngorhinootologie*, 75: 687-690, 1996.

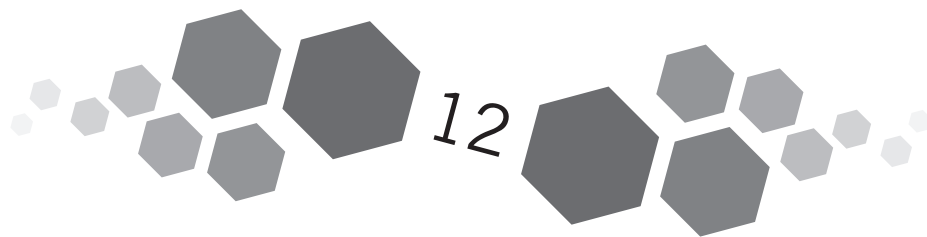
Serviço de Epidemiologia do Instituto de Infectologia Emilio Ribas. *Toxoplasmose. Informe semanal – sem 11* (14/03 a 20/03/1999). São Paulo, 1999.

SILVA, C. S. *et al*. Postnatal acquired toxoplasmosis patients in an infectious disease reference center. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 12: 438-441, 2008.

SILVA, L. A. *et al*. Toxoplasmose de sistema nervoso central em paciente sem evidência de imunossupressão: relato de caso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 34: 487-490, 2001.

THEOLOGIDES, A. & KENNEDY, B. J. Toxoplasmic myocarditis and pericarditis (editorial). *The American Journal of Medicine*, 47: 169-174, 1969.

TOWNSEND, J. J. *et al*. Acquired toxoplasmosis: a neglected cause of treatable nervous system disease. *Archives of Neurology*, 32: 335-343, 1975.

VISCHER, T. L.; BERHEIM, C. & ENGELBRECHT, B. Two cases of hepatitis due to *Toxoplasma gondii*. *The Lancet*, 2: 919-921, 1967.

Toxoplasmose em Pacientes Imunocomprometidos e com Aids

Vivian Iida Avelino-Silva • Esper Georges Kallás

Na infecção humana aguda por *Toxoplasma gondii*, a resposta imune não é capaz de eliminar todos os parasitas presentes no organismo. Muitos deles são conservados sob a forma de bradizoítas em cistos quiescentes nos tecidos, principalmente na musculatura esquelética e no sistema nervoso central (SNC), frequentemente por toda a vida. A integridade do sistema imune tem, então, o importante papel de manter o estado de latência clínica da toxoplasmose (Amato Neto *et al*., 2008).

Até a década de 1980, a toxoplasmose foi raramente descrita em pacientes imunocomprometidos por diversas causas, como imunodeficiências congênitas, neoplasias e imunossupressão por meio de medicamentos, manifestando-se sob a forma de encefalite, miocardite e pneumonia (Amato Neto *et al*., 2008). Mais recentemente, com o uso ampliado de terapias imunossupressoras cada vez mais potentes, infecções parasitárias do SNC podem ser observadas com maior frequência e gravidade clínica. O risco de ocorrência de infecções de SNC varia conforme o tipo de imunossupressão e o órgão transplantado, e, entre receptores de transplante de medula óssea (TMO), o risco é maior nos receptores de transplantes alogênicos. Pacientes submetidos a períodos prolongados de imunossupressão intensa, tais como receptores de TMO com doença do enxerto *versus* hospedeiro ou receptores de órgãos sólidos com rejeição do órgão transplantado, apresentam maior risco de infecções oportunistas do SNC. *T. gondii* é o agente mais frequente de infecções parasitárias de SNC em tais pacientes (Walker & Zunt, 2005).

Foi a partir da década de 1980, no contexto da síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids), que as formas de reativação da toxoplasmose no imunocomprometido assumiram maior importância epidemiológica, principalmente em regiões de elevada prevalência de infecção pelo *T. gondii*, como o Brasil (Amato Neto *et al*., 2008; Pereira-Chioccola, Vidal & Su, 2009).

A encefalite por *T. gondii* é considerada doença definidora de Aids, sendo a mais frequente das doenças oportunistas de acometimento cerebral, tanto em países em desenvolvimento quanto em vários países desenvolvidos. Desde o advento da terapia antirretroviral altamente potente (também conhecida como *highly active antiretroviral therapy* – Haart), observou-se importante progresso no tratamento da infecção pelo HIV e recuperação imunológica dos

pacientes. Em países em desenvolvimento e com menor acesso à Haart, o impacto da terapia na redução das doenças definidoras tende a ser inferior, e a toxoplasmose permanece como importante causa de morbidade e mortalidade em pacientes com HIV/Aids (Pereira-Chioccola, Vidal & Su, 2009).

PATOGENIA E RESPOSTA IMUNE

Após a ingestão de cistos ou oocistos de toxoplasma, o curso da infecção humana em geral é benigno e autolimitado, mas pode variar conforme o volume do inóculo, a virulência do parasita, características genéticas e *status* imunológico do hospedeiro. A reação imune se desenvolve nas primeiras semanas de infecção e caracteriza-se pela formação de resposta imune adaptativa com intensa polarização de resposta tipo 1, associada à produção de anticorpos das classes IgG, IgM, IgA e IgE. Taquizoítas extracelulares são então eliminados dos tecidos, enquanto alguns parasitas intracelulares diferenciam-se em formas latentes (bradizoítas), circundados por um vacúolo parasitóforo e uma parede cística. Tais cistos possuem a capacidade de escapar à resposta imune e permanecer na forma latente indefinidamente, localizando-se preferencialmente na musculatura esquelética e no SNC. Durante a evolução em indivíduos imunocompetentes, pode ocorrer ruptura de alguns cistos teciduais, mas os bradizoítas liberados são normalmente eliminados pela resposta imune do hospedeiro, sem que ocorra a produção de taquizoítas teciduais (Amato Neto *et al.*, 2008).

Em indivíduos imunocomprometidos, cistos quiescentes podem sofrer reativação. Alterações qualitativas e quantitativas em linfócitos T, associadas a menor produção de IFN-γ e outras citocinas de padrão Th1, podem estar associadas à perda da capacidade de contenção da infecção em sua forma latente. Como resultado, ocorre conversão de bradizoítas em taquizoítas ativos com elevada capacidade de replicação e destruição tecidual. Devido à localização preferencial no SNC, os episódios de reativação frequentemente acometem o encéfalo e a retina. A preferência de *T. gondii* pelo tecido cerebral ainda não é bem compreendida, mas acredita-se que o parasita toma proveito do ambiente 'imunoprivilegiado', isto é, que apresenta um estrito controle anti-inflamatório (Walker & Zunt, 2005; Pereira-Chioccola, Vidal & Su, 2009; Suzuki, 2002).

Em receptores de transplantes, a toxoplasmose pode ocorrer após reativação de um foco latente de infecção (reativação), ou como infecção aguda, após ingestão de cistos ou oocistos do parasita ou ainda pela transferência de cistos viáveis do órgão transplantado ao receptor. Nesse caso, pacientes sem infecção prévia por *T. gondii* e submetidos a transplante cardíaco de doadores soropositivos encontram-se sob maior risco.

Em pacientes infectados por HIV a toxoplasmose é mais frequentemente causada por reativação de focos latentes do parasita. Um terço dos pacientes com IgG específica contra *T. gondii* desenvolve a doença de reativação. Entretanto, a ausência de IgG sérica não exclui o diagnóstico de encefalite por toxoplasma, embora isso seja raro. A incidência da doença é reduzida em pacientes submetidos a uso profilático de sulfametoxazol-trimetoprim ou dapsona e pirimetamina (Walker & Zunt, 2005; Kaplan *et al.*, 2009).

QUADRO CLÍNICO E DIAGNÓSTICO

Manifestações clínicas da toxoplasmose aguda ou da reativação em pacientes imunocomprometidos podem variar conforme o tipo e intensidade da imunossupressão. Diferenças entre as apresentações em pacientes com infecção por HIV e pacientes transplantados poderiam ser atribuídas, entre outros fatores, à depleção seletiva de linfócitos T $CD4^+$ na Aids, enquanto pacientes transplantados apresentam imunossupressão mais ampla (Walker & Zunt, 2005).

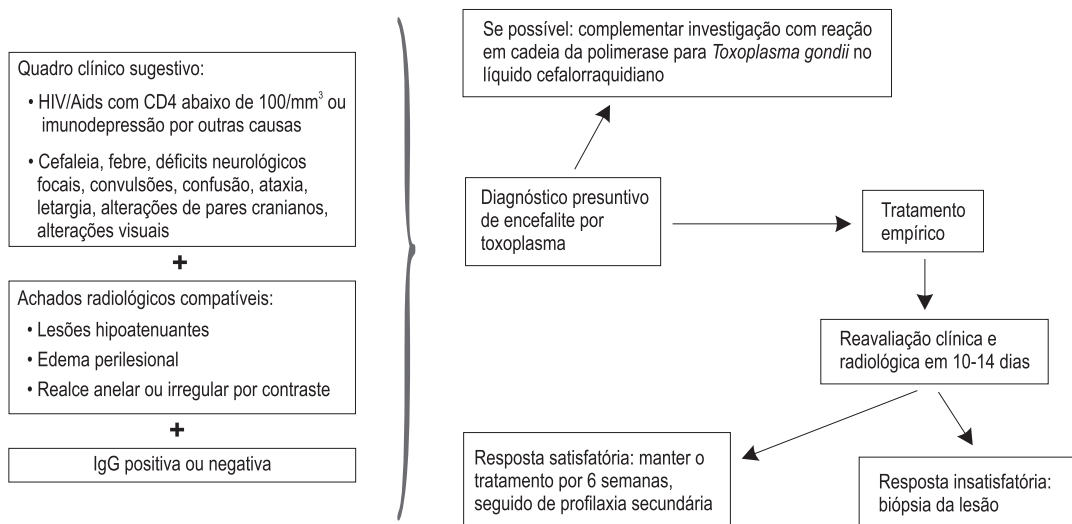
A principal manifestação da toxoplasmose em pacientes imunocomprometidos é a encefalite, comumente caracterizada por lesões focais únicas ou, mais frequentemente, múltiplas. A apresentação em geral é subaguda, podendo ser aguda em cerca de 10% dos casos, e as manifestações clínicas variam conforme o número e a localização das lesões. As queixas mais frequentes são cefaleia, febre, déficits neurológicos focais, convulsões, confusão mental, ataxia, letargia, alterações de pares cranianos e alterações visuais. Raramente podem ocorrer lesões na medula espinhal, associadas a sintomas de dor local, paraparesias, déficits sensoriais e bexiga neurogênica (Amato Neto *et al.*, 2008; Walker & Zunt, 2005; Pereira-Chioccola, Vidal & Su, 2009; Kaplan *et al.*, 2009). As principais manifestações clínicas da encefalite por toxoplasma estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Principais manifestações clínicas da encefalite por toxoplasma em imunocomprometidos

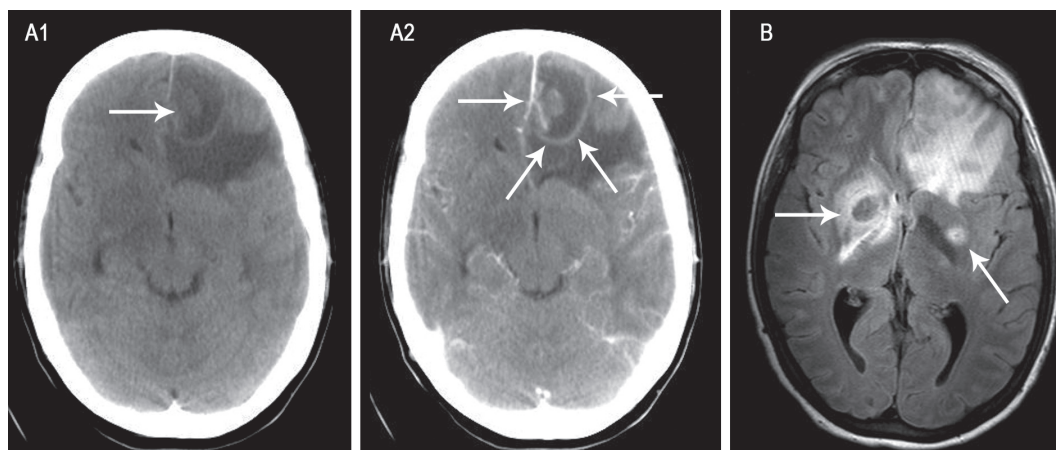
Manifestações clínicas	Frequência de apresentação
Cefaleia	49%-63%
Febre	41%-68%
Déficits focais	22%-80%
Convulsões	19%-29%
Confusão mental	15%-52%
Ataxia	15%-25%
Letargia	12%-44%
Alterações de pares cranianos	12%-19%
Alterações visuais	8%-15%

O diagnóstico definitivo da encefalite por *T. gondii* é realizado por meio de demonstração direta de taquizoítas no tecido cerebral, com fragmento obtido em biópsia ou necrópsia. Considerada a dificuldade técnica para execução da biópsia cerebral, na maioria dos casos o diagnóstico é realizado de forma presuntiva, associando-se critérios clínicos, radiológicos, sorológicos e moleculares. A confirmação diagnóstica é feita mediante a resposta clínica e radiológica após dez a 14 dias de tratamento (Walker & Zunt, 2005; Kaplan *et al.*, 2009).

Observa-se na Figura 1 um fluxograma de atendimento ao paciente imunocomprometido com suspeita de encefalite por toxoplasma.

Figura 1 – Fluxograma de atendimento ao paciente imunocomprometido com suspeita de encefalite por toxoplasma

Aspectos Radiológicos

Tanto a tomografia computadorizada (TC) quanto a ressonância nuclear magnética (RNM) podem ser utilizadas na investigação de quadros sugestivos de encefalite em pacientes imunocomprometidos, entretanto a RNM oferece maior sensibilidade diagnóstica, particularmente para identificação de lesões pequenas ou localizadas na fossa posterior. As lesões típicas da encefalite por toxoplasma são hipoatenuantes, associadas a edema perilesional e apresentam realce anelar após administração de contraste radiológico. Lesões atípicas, sem realce por contraste e com efeito expansivo podem ser observadas em cerca de 20% dos casos. Receptores de transplantes podem apresentar padrões mais irregulares de realce após administração de contraste radiológico, com relação inversa entre o realce das lesões e a intensidade da imunossupressão (Pereira-Chioccola, Vidal & Su, 2009; Kaplan *et al.*, 2009) (Figura 2).

Figura 2 – Achados em tomografia computadorizada (A1 e A2) e ressonância nuclear magnética (B) em paciente com Aids e encefalite por *Toxoplasma gondii*

A1 – Fase pré-contraste da tomografia computadorizada. A2 – Fase pós-contraste da tomografia computadorizada. Em ambas, nota-se a lesão frontal hipoatenuante (seta), com realce anelar após a injeção de contraste intravenoso (setas), além de edema hipoatenuante perilesional e efeito de massa, com desvio da linha média. Em outra topografia, nota-se na ressonância nuclear magnética (B) a extensão do edema e a presença de outras lesões, inclusive acometendo o hemisfério contralateral (setas).

Diagnósticos Diferenciais

Como não existem sintomas ou sinais clínicos ou radiológicos patognomônicos da encefalite por *T. gondii*, deve-se considerar a possibilidade de diagnósticos diferenciais, sempre levando em consideração a condição imune e a situação epidemiológica do hospedeiro.

Em países desenvolvidos, o linfoma primário do SNC é o principal diagnóstico diferencial da encefalite por *T. gondii*. Por outro lado, em países em desenvolvimento devem-se admitir como principais diagnósticos diferenciais as formas focais de neurotuberculose, além de outras infecções do SNC (doença de Chagas, criptococose, aspergilose). Outros diagnósticos diferenciais possíveis incluem abscessos bacterianos, tumores primários e metastáticos e doenças vasculares (Pereira-Chioccola, Vidal & Su, 2009).

Em pacientes com infecção pelo HIV, a encefalite por *T. gondii* habitualmente acomete indivíduos com contagens de linfócitos T $CD4^+$ abaixo de $100/mm^3$, enquanto o linfoma primário do SNC e a neurotuberculose acometem, respectivamente, indivíduos com contagens de linfócitos T $CD4^+$ abaixo de $50/mm^3$ e abaixo de $200/mm^3$ (Kaplan *et al.*, 2009).

Diagnóstico Imunológico

Na suspeita de infecção aguda por *T. gondii* em pacientes imunocomprometidos, a avaliação sorológica inicial é realizada por meio da pesquisa de anticorpos da classe IgM. A soroconversão para IgM recente documentada caracteriza a infecção aguda; entretanto, em indivíduos sem sorologia prévia pode-se recorrer a testes de avidez de anticorpos da classe IgG para estimar o tempo de infecção, tal como recomendado na suspeita da infecção congênita.

Na suspeita da doença por reativação, forma mais comum em pacientes com encefalite por toxoplasma na Aids, é recomendada a pesquisa de anticorpos séricos da classe IgG. Embora a identificação de IgG positiva seja pouco elucidativa em regiões geográficas de elevada prevalência da infecção, a identificação de IgG negativa está associada a elevado valor preditivo negativo da doença de reativação. Por outro lado, em até 5% dos pacientes imunocomprometidos com encefalite por toxoplasma os anticorpos IgG podem não ser detectáveis, e a sorologia negativa não deve excluir ou retardar a introdução do tratamento empírico da doença (Pereira-Chioccola, Vidal & Su, 2009; Kaplan *et al.*, 2009).

A detecção sérica de antígenos excretórios/secretórios, produzidos pela atividade de taquizoítas, e de bandas oligoclonais de IgG no líquido cefalorraquidiano são outros métodos imunológicos que podem sugerir a doença de reativação, porém com sensibilidade e especificidade variáveis e disponibilidade limitada na prática clínica.

Diagnóstico Molecular

Métodos diagnósticos moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), que amplifica fragmentos do genoma do parasita, têm sido empregados nos últimos anos e são particularmente úteis para a avaliação complementar em pacientes imunocomprometidos, uma vez que apresentam elevada especificidade, não sofrem influência da imunossupressão e podem reduzir a necessidade de procedimentos invasivos.

A PCR pode ser utilizada em amostras de sangue periférico ou de líquido cefalorraquidiano (LCR), apresentando sensibilidade variável (16%-86% e 11,5%-100%, respectivamente) conforme a qualidade da amostra, condições físico-químicas da reação e sondas e *primers* utilizados. Já a especificidade em amostra de LCR é elevada, variando entre 96% e 100% em diferentes estudos (Pereira-Chioccola, Vidal & Su, 2009).

A amostra clínica deve ser coletada antes da introdução da terapia ou até três dias após seu início, com redução importante da sensibilidade do teste após a primeira semana de tratamento.

TRATAMENTO E PREVENÇÃO

O tratamento da encefalite por *T. gondii* em pacientes com Aids ou por outras causas de imunossupressão deve ser prontamente instituído, no momento da identificação de quadro clínico e radiológico compatível.

O tratamento de escolha é a associação de sulfadiazina (na dose de 1,0 g a 1,5 g a cada seis horas) e pirimetamina (na dose de 100 mg a 200 mg no primeiro dia, seguida de 50 mg ao dia por via oral). Recomenda-se ainda o uso de ácido folínico na dose de 15 mg ao dia, para redução de eventos hematológicos adversos do tratamento com pirimetamina. Para pacientes intolerantes a derivados da sulfa, um tratamento alternativo é a associação de 600 mg de clindamicina, pirimetamina a cada seis horas e ácido folínico. A associação de sulfametoxazol-trimetoprim na dose de 25 mg/5 mg/kg a cada 12 horas por via endovenosa pode ser usada como esquema alternativo, principalmente para pacientes com restrições ao uso de medicações por via oral (Pereira-Chioccola, Vidal & Su, 2009; Kaplan *et al*., 2009).

Há ainda outros esquemas terapêuticos alternativos avaliados em trabalhos não controlados, séries e relatos de casos (Quadro 1).

No caso de lesões encefálicas com importante edema e/ou efeito de massa, levando ao desvio de linha média e/ou risco iminente de herniação, é recomendada a administração adjuvante de corticosteroides. É importante considerar que os corticosteroides podem reduzir o edema e o processo inflamatório associado à lesão, o que frequentemente interfere na reavaliação clínica e radiológica do paciente. O uso dos corticosteroides deve, portanto, ser restrito às situações clínicas descritas acima, para não interferir no julgamento de resposta ao tratamento.

Medicações anticonvulsivantes devem ser administradas a pacientes com manifestação convulsivas, e não estão indicadas profilaticamente.

As drogas antiparasitárias utilizadas atuam primariamente nos taquizoítas, sendo incapazes de erradicar os bradizoítas teciduais. O hospedeiro permanece suscetível à reativação da infecção enquanto se perpetua a condição imunossupressora. Deve-se, portanto, introduzir a profilaxia secundária da infecção, com sulfadiazina na dose de 500 mg a cada seis horas associada à pirimetamina na dose de 25 mg a 50 mg ao dia e ácido folínico (15 mg ao dia), desde o término do tratamento de ataque, até a recuperação imunológica, com elevação sustentada (por pelo menos seis meses) de linfócitos T $CD4^{+}$ acima de 200 células/mm^3 no caso de pacientes com Aids. A profilaxia secundária alternativa para pacientes intolerantes a derivados de sulfa é realizada com pirimetamina associada à clindamicina na dose de 600 mg a cada oito horas (Pereira-Chioccola, Vidal & Su, 2009; Kaplan *et al*., 2009).

É recomendada ainda a profilaxia primária da encefalite por toxoplasma em pacientes com sorologia positiva para *T. gondii* e contagens de linfócitos T $CD4^{+}$ abaixo de 100 células/mm^3, com sulfametoxazol-trimetoprim (800 mg/160 mg ao dia), até a elevação sustentada (por pelo menos três meses) de linfócitos T $CD4^{+}$ acima de 200 células/mm^3 (Pereira-Chioccola, Vidal & Su, 2009; Kaplan *et al*., 2009).

No Quadro 1 podem ser verificados os principais esquemas empregados no tratamento da encefalite por *T. gondii* e os esquemas preconizados para profilaxia primária e secundária da doença.

Quadro 1 – Esquemas para tratamento e profilaxia da encefalite por *T. gondii* em pacientes imunocomprometidos

<table>
<tr><td colspan="2">
Tratamento agudo da encefalite por Toxoplasma gondii

Esquema preferencial:

Sulfadiazina 1,0 g-1,5 g 6/6 horas + pirimetamina 50 mg ao dia (dose inicial de 100 mg-200 mg) + ácido folínico 15 mg ao dia por via oral

Esquema para pacientes intolerantes a derivados de sulfa:

Clindamicina 600 mg 6/6 horas + pirimetamina + ácido folínico por via oral

Esquema para administração intravenosa:

Sulfametoxazol-trimetoprim 25 mg/5 mg/kg 12/12 horas por via intravenosa

Esquemas alternativos com eficácia não demonstrada:

Atovaquona + pirimetamina + ácido folínico

Atovaquona

Azitromicina + pirimetamina + ácido folínico

Claritromicina + pirimetamina

5-fluorouracil + clindamicina

Dapsona + pirimetamina + ácido folínico

Minociclina ou doxiciclina + pirimetamina + ácido folínico

Minociclina ou doxiciclina + sulfadiazina

Minociclina ou doxiciclina + claritromicina

Duração do tratamento: 6 semanas ou mais, de acordo com a resposta clínica e radiológica
</td></tr>
<tr><td>
Profilaxia primária

Esquema preferencial:
Sulfametoxazol-trimetoprim 800 mg/160 mg ao dia, via oral

Esquema alternativo:
Sulfametoxazol-trimetoprim 800 mg/160 mg 3 vezes por semana, por via oral

Esquema para pacientes intolerantes a derivados de sulfas:
Dapsona 50 mg ao dia + pirimetamina + ácido folínico
Atovaquona 1.500 mg ao dia + pirimetamina + ácido folínico
Atovaquone
</td><td>
Indicação da profilaxia

Início: pacientes com T $CD4^+$ abaixo de $100/mm^3$, sem diagnóstico prévio de encefalite por Toxoplasma gondii

Término: elevação sustentada (3 meses) de T $CD4^+$ acima de $200/mm^3$
</td></tr>
<tr><td>
Profilaxia secundária

Esquema preferencial:
Sulfadiazina 500 mg 6/6 horas + pirimetamina 25 mg-50 mg ao dia + ácido folínico 15 mg ao dia por via oral

Esquemas para pacientes intolerantes a derivados de sulfas:
Clindamicina 600 mg 8/8 horas + pirimetamina + ácido folínico
Atovaquona 750 mg cada a 6-12 horas + pirimetamina ou sulfadiazina
Atovaquona
</td><td>
Indicação da profilaxia

Início: após término do tratamento de ataque. Reintrodução se houver queda de T $CD4^+$ abaixo de $100/mm^3$

Término: elevação sustentada (seis meses) de T $CD4^+$ acima de $200/mm^3$. Reintrodução se houver queda de T $CD4^+$ abaixo de $200/mm^3$
</td></tr>
</table>

Em pacientes imunocomprometidos pelo HIV sem tratamento antirretroviral e com diagnóstico de encefalite por *T. gondii*, não existe consenso sobre o momento ideal de introdução da terapia antirretroviral. A introdução imediata poderia ser prejudicial ao paciente em virtude do grande número de comprimidos e associação de eventos adversos, principalmente hematológicos e alérgicos. Por outro lado, a introdução tardia poderia comprometer a reconstituição imune e o prognóstico da doença oportunista. Até o momento grande parte dos especialistas tem recomendado a introdução da terapia antirretroviral entre duas e quatro semanas após o início da terapia antiparasitária, mas mais estudos são necessários para responder a essa questão (Pereira-Chioccola, Vidal & Su, 2009; Kaplan *et al*., 2009).

A prevenção da infecção por *T. gondii* é feita por meio de medidas de higiene, visando evitar o contato e a ingestão de oocistos e cistos teciduais do parasita. Oocistos são eliminados nas fezes de felídeos infectados e estão, portanto, presentes no meio ambiente; cistos teciduais podem estar presentes na musculatura e no tecido encefálico de diversos mamíferos e aves infectados. Indivíduos não infectados, particularmente gestantes e imunocomprometidos, devem evitar o contato com felídeos e com locais potencialmente contaminados, tais como solo e caixas de areia; devem ainda manter higiene cuidadosa de alimentos e água e evitar o consumo de carnes malcozidas, onde os cistos teciduais se encontram viáveis. Até o momento, não existe profilaxia por meio de imunização passiva ou ativa (Amato Neto *et al*., 2008).

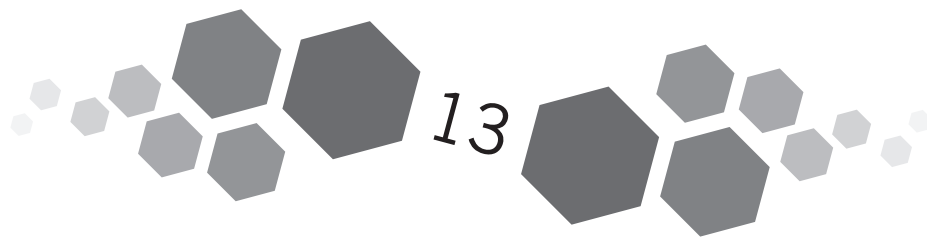
REFERÊNCIAS

AMATO NETO, V. *et al*. *Parasitologia: uma abordagem clínica*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

KAPLAN, J. E. *et al*. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 58(RR4): 1-198, 2009. (Centers for Disease Control and Prevention).

PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; VIDAL, J. E. & SU, C. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future Microbiology*, 4(10): 1.363-1.379, 2009.

SUZUKI, Y. Host Resistance in the Brain against *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Infectious Diseases*, 185, supl. 1: S58-S65, 2002.

WALKER, M. & ZUNT, J. R. Parasitic central nervous system infections in immunocompromised hosts. *Clinical Infectious Diseases*, 40(7): 1.005-1.015, 2005.

Toxoplasmose na Criança e Neurotoxoplasmose

Saul Cypel

A toxoplasmose é uma das zoonoses mais difundidas no mundo, causada pelo *Toxoplasma gondii*, um diminuto parasita intracelular (2 μm a 5 μm), rapidamente identificado em lâminas com fixação de Wright ou Giemsa. Estima-se que mais de um terço da população mundial esteja infectada (Dubey, 2000; Tenter, Heckeroth & Weiss, 2000). Nos brasileiros, a soroprevalência ocorre numa faixa de 40% a 80%; em regiões de condições socioeconômicas mais baixas esta imunidade já pode ser verificada precocemente, em torno dos 2 anos de idade (Francisco *et al*., 2006). Numa abordagem global, verifica-se que a prevalência em crianças oscila entre 0% e 71,43%: Paquistão, 17,4%; Israel, 20,5% nas populações rurais; Espanha, 12,25%; Itália, 14,4%; Taiwan, 15,9%; México, 1,9%; Guatemala, 43%; Cuba, 57%; Argentina, 51,75% (Sanchez *et al*., 2008).

Em humanos, a toxoplasmose pode ser congênita ou adquirida durante a vida. A toxoplasmose congênita, cuja doença materna se transmite ao concepto por via intrauterina, é descrita no capítulo 10.

A toxoplasmose adquirida, por sua vez, trata-se em geral de uma infecção autolimitada e de risco baixo em crianças com estado de imunidade normal. As crianças imunocompetentes costumam adquirir a doença uma vez na vida, e adquirem a partir de então imunidade celular e humoral definitiva.

A possibilidade de o indivíduo se infectar com *T. gondii* está relacionada a hábitos alimentares. O contágio se dá por meio da ingestão de alimentos malcozidos e carne crua, por ingestão de alimentos ou água contaminados com cistos viáveis do protozoário – por meio de pelos ou excreções de gatos e outros animais (Moura *et al*., 2006).

Boa parte das crianças infectadas permanece assintomática e outras têm sintomas muito discretos. Entretanto, podem apresentar-se morbidade e mortalidade importantes se indivíduos imunocomprometidos forem afetados.

É de ressaltar que até o ano de 1975 pacientes com clínica evidente da doença no sistema nervoso eram relativamente raros, e a literatura médica continha somente 45 descrições de casos bem documentados em adultos, metade dos quais ocorrera em pacientes com doença sistêmica subjacente como neoplasias malignas, transplantes renais, colagenoses (Townsend *et al*., 1975), e submetidos a tratamento com drogas imunossupressoras.

Adquire-se a infecção quando são ingeridos bradizoítas com cistos ou esporozoítas dentro de oocistos, sendo degradados pela tripsina ou pepsina no estômago, os quais a seguir invadem as células da parede intestinal. A partir da disseminação linfoematogênica, chegam aos vários órgãos, podendo produzir inflamação e até necrose.

Há consenso sobre o fato de que a grande maioria dos indivíduos desenvolve a toxoplasmose-infecção e mais raramente a toxoplasmose-doença. Em estudos sorológicos populacionais, observa-se a presença de anticorpos contra *T. gondii* sem o relato de nenhum antecedente de alterações clínicas correspondentes à doença.

A toxoplasmose adquirida em crianças imunocompetentes, quando sintomática, pode expressar-se clinicamente por linfadenopatia, mais comumente identificada na região cervical, dolorosa ou não, podendo ser mais difusa e manter-se por vários meses. Em algumas circunstâncias, gera dificuldades no diagnóstico diferencial de apendicite aguda, quando a linfadenopatia é de localização mesentérica, ou até mesmo de câncer mamário, quando a localização é torácica. Os gânglios afetados têm histopatologia característica, com infiltração de células epitelioides disseminando-se e apagando os limites dos centros germinativos, e presença de células monocitoides provocando distensão focal dos seios subcapsular e trabecular.

Febre pode ou não estar presente mesmo com evidências dos gânglios aumentados. Amato Neto e colaboradores (1975) comentam que a febre esteve ausente em 27% dos seus casos; quando presente, é de caráter vespertino, mantendo-se por um período médio de um mês. Há raros casos de crianças imunocompetentes com toxoplasmose adquirida que apresentam comprometimento severo de órgãos vitais ou óbito.

Teutsch e colaboradores (1979) acompanharam 37 casos de toxoplasmose aguda numa epidemia causada por gatos e ressaltam como manifestações mais frequentes – ocorrendo em cerca de 50% ou mais dos casos: febre, linfadenopatia, dor de cabeça, mialgia, dificuldade para movimentar o pescoço, anorexia e dor de garganta. Fica evidente que essas manifestações clínicas correspondem a sinais e sintomas gerais que poderiam estar relacionados a outras entidades infecciosas. A ocorrência de casos simultâneos numa mesma família indica a existência de uma fonte contaminadora no ambiente que precisa ser identificada.

Em casos excepcionais, a infecção poderá atingir a musculatura – preferencialmente e de modo difuso –, desenvolvendo-se quadros de miosite ou polimiosite com a presença de cistos detectáveis em biópsia dos tecidos afetados. O processo inflamatório local produz dor e impotência funcional, podendo persistir por até dez meses (Belman, 1987).

A toxoplasmose passou a ganhar maior evidência a partir da década de 1960 com a verificação de crescente e grave ocorrência em pacientes imunocomprometidos, mais especialmente nos casos de Aids. Embora a infecção primária ou a reativação de um quadro crônico possa afetar qualquer órgão, observa-se que frequentemente o sistema nervoso central está acometido, havendo risco de vida elevado, principalmente nos casos em que ocorre encefalite (Dubey, 2000; Dupouy-Camet *et al.*, 1993; Colombo *et al.*, 2005). Ressalte-se que nesses casos a toxoplasmose resulta de infecção latente.

Embora a toxoplasmose cerebral adquirida seja uma complicação importante da Aids em adultos, em crianças parece não ser tão comum. Cerca de 40% dos pacientes adultos com Aids sem terapia antirretroviral muito ativa (HAART) desenvolvem toxoplasmose-doença nos casos em que existe anticorpo plasmático para *T. gondii,* indicando infecção latente prévia. Em crianças, as descrições de quadros encefalíticos são ocasionais e encontram-se publicadas geralmente sob a forma de relatos de caso.

Risco importante de toxoplasmose-doença grave também ocorre em indivíduos com doenças sistêmicas nas quais os recursos imunológicos se encontram alterados, como nas doenças do colágeno, nos transplantes renais e mesmo nas neoplasias.

Nessas circunstâncias, pode desenvolver-se miocardite, hepatite, nefropatia, alterações oculares, falência respiratória aguda e alterações hemodinâmicas semelhantes a um quadro de choque séptico bacteriano. Entretanto, com maior frequência observa-se a presença de alterações neurológicas, polimiosite e linfadenopatia.

A instalação da doença pode ser aguda e de tipo fulminante, com *rash* cutâneo, confusão mental, convulsões, sinais de miocardite e polimiosite. No entanto, o mais comum é a instalação subaguda por meio de sinais neurológicos focais.

O início do quadro encefalítico se dá de modo variado. Em algumas circunstâncias se expressa por meningoencefalite ou encefalite exclusiva (toxoplasmose encefálica – TE). Observa-se febre, confusão mental, convulsões focais ou generalizadas, sinais meníngeos e coma. Os sinais focais podem surgir como alterações da fala do tipo afásica, hemiparesia, sinais de acometimento de nervos cranianos, alterações do tônus do tipo parkinsoniano, mielopatia cervical e/ou torácica, lesão do cone medular e outras menos frequentes.

Em alguns pacientes, observam-se alterações comportamentais sugestivas de quadro psiquiátrico como ansiedade exagerada, agitação e perda rápida das competências cognitivas, com aspecto demencial.

Quadros agudos com essas características emocionais poderão ser observados em TE em atividade. Entretanto, existem trabalhos em que se procura relacionar quadros psiquiátricos mais crônicos e de maior gravidade, como a esquizofrenia, com a presença de toxoplasmose latente. Esses trabalhos baseiam-se em investigações experimentais e estudos em humanos que comparam grupos de pacientes adultos infectados e não infectados por meio de questionários de avaliação de personalidade. Sugerem que as modificações comportamentais estejam relacionadas à elevação nos níveis de dopamina, gerando um desequilíbrio entre o funcionamento das regiões mesolímbica e mesocortical. De acordo com Flegr (2007),

> os resultados obtidos nos últimos 15 anos sugerem fortemente que a toxoplasmose latente influencia o comportamento não só dos hospedeiros roedores, mas também dos humanos. Os mecanismos neurofisiológicos e os efeitos práticos destas alterações comportamentais, entretanto, estão ainda para ser elucidados.

Serão necessárias investigações continuadas para estabelecer com mais exatidão essa correlação etiológica.

Em algumas circunstâncias, quando não há febre ou outros indicativos infecciosos, os sinais neurológicos focais podem sugerir a presença de um tumor cerebral, sendo necessária semiologia cuidadosa para o diagnóstico diferencial.

A entrada do parasita se dá por via intestinal, através do epitélio da mucosa, chegando ao sistema nervoso por via hematogênica por meio dos macrófagos ou das ramificações dendríticas (Lambert, 2006). *In vitro*, estudo em cérebro de camundongos demonstrou que os taquizoítas invadem a micróglia, os astrócitos e os neurônios, desenvolvendo cistos no interior destas células, sendo a mesma formação de cistos observada em estudos *in vitro* com neurônios humanos (Schwartzman, 1987).

Em estudos experimentais com cérebro de ratos cronicamente infectados, demonstrou-se que a maior parte dos cistos estava localizada em região neuronal, sendo identificados nos axônios, nos dendritos e no corpo do próprio neurônio. Além disso, podem ser observados no tecido glial.

Desse modo, verifica-se que *T. gondii* pode ser encontrado em vários tipos de células cerebrais, até mesmo nas células de Purkinje do cerebelo. Os efeitos e as reações à presença de *T. gondii* no sistema nervoso podem ser quase imediatos, como foi demonstrado por Blader, Manger e Boothroyd, em 2001, usando taquizoítas do tipo II de uma amostra para examinar os modelos de expressão gênica do hospedeiro em fibroblastos humanos infectados. Ficou evidente que o hospedeiro organiza uma importante resposta direcionada para alertar e ativar o sistema imunológico

para reagir à infecção. Cerca de 24 horas após a infecção, em que o parasita já pode se multiplicar de duas a quatro vezes, acontece uma variedade de transcrições glicolíticas e do mevalonato no hospedeiro, provavelmente em resposta à agressão nutritiva determinada pelo parasita. Novos estudos possivelmente poderão esclarecer melhor as bases moleculares dessas transcrições, inclusive as influências de *T. gondii* nos mecanismos de sinalização circuitária cerebral.

A essas alterações neurológicas podem agregar-se outras sistêmicas, complementando a gravidade do quadro, como pan-hipopituitarismo, secreção inapropriada de hormônio antidiurético, diabetes insípido, coriorretinite, falência hepática aguda e polimiosite.

O genótipo do parasita parece ter uma relação importante com o prognóstico da doença. *T. gondii* possui três linhagens diferentes de genótipo: os tipos I, II e III. O tipo II é o que predomina nos casos de encefalite dos pacientes com Aids e nos imunocomprometidos não Aids, em geral. Já nos casos em que ocorre afecção aguda com coriorretinite, verifica-se o envolvimento do tipo I, que apresenta tendência para uma evolução mais agressiva (Carruthers & Suzuki, 2007).

A participação dos mecanismos imunológicos dependentes do indivíduo infectado está diretamente relacionada ao prognóstico, mais especialmente à produção de citocinas geradas pelas células T que chegam ao cérebro quando ocorre a infecção. Outras citocinas são também produzidas pela micróglia, pelos astrócitos e mesmo pelos neurônios. Este conjunto de citocinas pode promover ou suprimir a resposta inflamatória, exercendo um papel fundamental na resistência do paciente e no desenvolvimento da doença. Outros mecanismos imunitários também participam por meio dos macrófagos, eosinófilos, monócitos, plaquetas, bem como pela opsonização com lise complemento-dependente do parasita. Infelizmente, até agora não foi possível desenvolver uma vacina para prevenção da toxoplasmose. Outros aspectos relacionados à resposta imunológica na infecção por *T. gondii* são abordados no capítulo 6.

Uma vez ocorrida a disseminação hematogênica, os bradizoítas e os taquizoítas podem acometer potencialmente qualquer órgão. Determinam inflamação e necrose dos tecidos; em seguida, organizam-se em cistos, que é a forma de resistência de *T. gondii*, contendo no seu interior centenas ou até milhares de parasitas, podendo assim permanecer por longos anos. Nos casos de pessoas imunocomprometidas, podem ocorrer lesões e sequelas importantes por ocasião da infecção inicial, porém o mais comum é que ocorram nas reincidências de uma infecção latente.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial inclui um conjunto de avaliações sorológicas indicativas de toxoplasmose aguda adquirida, de doença crônica latente ou mesmo de infecções congênitas. A infecção produz no indivíduo respostas de imunidade humoral e celular; os anticorpos presentes podem ser evidenciados com técnicas laboratoriais específicas para a determinação do diagnóstico, servindo também para apurar o tempo de aquisição da doença.

Em pacientes com toxoplasmose cerebral nos quais a morbidade e a mortalidade são importantes, é necessário empregar métodos laboratoriais sensíveis, pouco invasivos e cujos resultados sejam obtidos rapidamente. Nesse sentido, mostrou-se eficaz o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar a presença de *T. gondii* e de títulos elevados de IgG anti-*T. gondii* (Colombo, 2005). Testes como imunofluorescência indireta e outros de maior complexidade podem ser realizados para precisão do diagnóstico. No capítulo 9, estes estudos laboratoriais são mais bem discutidos.

A biópsia de gânglios ou de qualquer outro tecido e o adequado exame histopatológico proporcionam elementos indicativos para o diagnóstico da toxoplasmose, e podem demonstrar o parasita em replicação e até mesmo seu isolamento.

Mesmo com a introdução da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART – *highly active antiretroviral therapy*) e, consequentemente, tendo havido redução nas infecções oportunísticas, ainda são relativamente frequentes os casos de infecção do sistema nervoso.

Com relação à neurotoxoplasmose, o exame do líquido cefalorraquidiano e o de neuroimagem são fundamentais para o diagnóstico. São exames de execução rápida e resultados de curto prazo, visto que são aplicados a pacientes que possuem imunidade comprometida e necessitam de rápido esclarecimento diagnóstico para que as medidas terapêuticas sejam adotadas.

A neurotoxoplasmose pode apresentar-se nos pacientes imunocomprometidos com múltiplos sinais e sintomas e com composições diferentes para cada caso. Como já referido, uma das formas de apresentação é a meningoencefalite; por conta disso, observa-se a presença de sinais de irritação meníngea (rigidez de nuca, sinais de Kernig e Brudzinski), confusão mental, convulsões focais ou generalizadas e até coma. É fundamental nesse momento o exame do líquido cefalorraquidiano. Como resultado, verifica-se pleocitose de predomínio linfomononuclear, com discreta a moderada elevação da proteinorraquia, glicose normal ou hipoglicorraquia, com elevação da produção local de anticorpos contra *T. gondii*.

Empregam-se também técnicas de biologia molecular no líquido cefalorraquidiano para esclarecimento do diagnóstico de TE. A PCR nessas condições apresenta sensibilidade variável (11,5% a 100%), porém a especificidade é alta (96% a 100%). Colombo e colaboradores, em 2005, empregando esses métodos moleculares, verificaram alta sensibilidade e especificidade e relacionaram estes achados ao uso da sequência B1 de *primers* no ensaio com PCR, mais especificamente o B22 e o B23. O método é considerado simples de realizar e menos sensível a contaminação, permitindo ganho de tempo e benefício para o início do tratamento farmacológico.

As sorologias quantitativas e a PCR sanguínea podem ser bastante úteis no diagnóstico da encefalite por toxoplasma. A PCR sanguínea apresenta sensibilidade de 16% a 86%, quando realizada de imediato na suspeita diagnóstica. O tratamento medicamentoso pode reduzir a sensibilidade a esse método diagnóstico se a coleta sanguínea for realizada após uma semana da sua introdução.

Os exames radiológicos mostram alterações significativas, muitas vezes sugestivas do diagnóstico de neurotoxoplasmose. Na tomografia computadorizada do crânio (TAC) são observadas lesões cerebrais múltiplas, em sua maioria nos limites corticossubcorticais (ou corticomedulares) e até mesmo nos gânglios da base. A injeção de contraste determina halo de realce, com aspecto anelar nesses locais e corresponde provavelmente a lesões inflamatórias e necróticas.

A ressonância nuclear magnética (RNM), por sua vez, fornece informações mais precisas e permite melhor evidência anatômica dos achados da TAC, tornando evidentes as imagens anelares das lesões toxoplásmicas após a injeção de gadolíneo (Figura 1).

Em algumas circunstâncias, o quadro clínico-neurológico dos pacientes imunocomprometidos apresenta dificuldades em relação ao diagnóstico diferencial. As manifestações neurológicas focais, a presença associada de cefaleia e vômitos, podem mimetizar o que se observa nos quadros de tumor cerebral. Mesmo os exames de imagem, numa primeira abordagem, mostram lesões com aspecto de massa ocupando o espaço, deslocando estruturas vizinhas, como nos indivíduos com neoplasia intracraniana. É fundamental empregar recursos adicionais nos exames de imagem – técnica de perfusão, por exemplo (Figura 2) – para distinguir entre alteração de tipo inflamatório ou neoplásico.

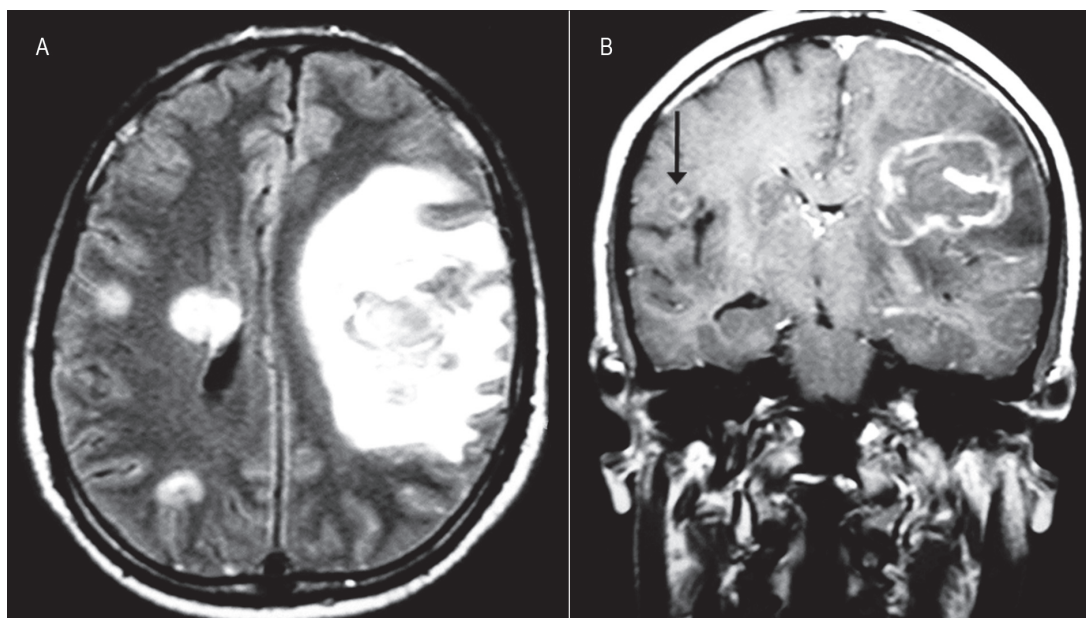
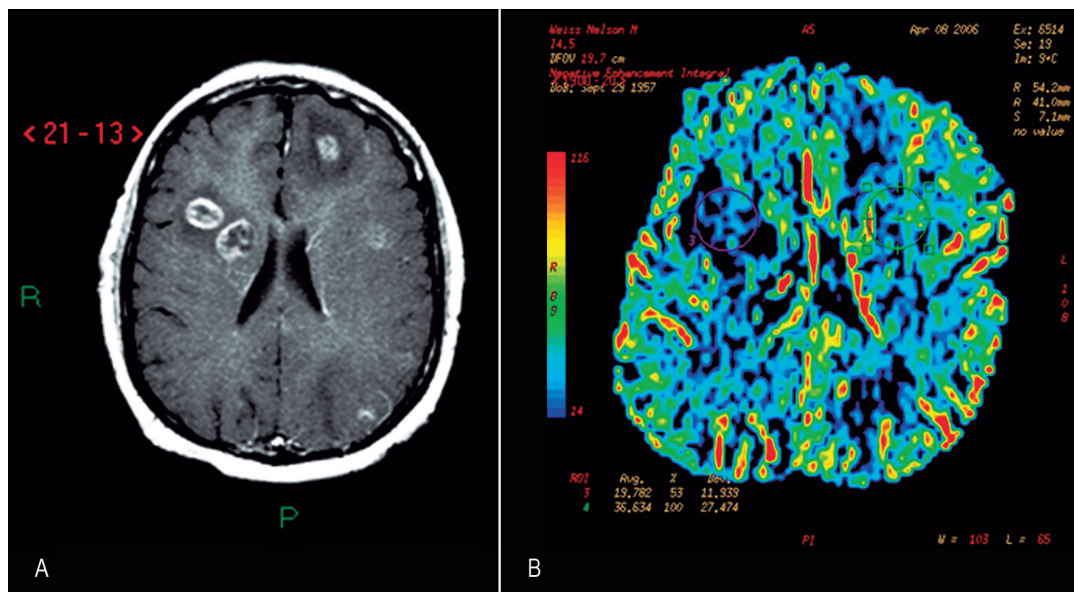
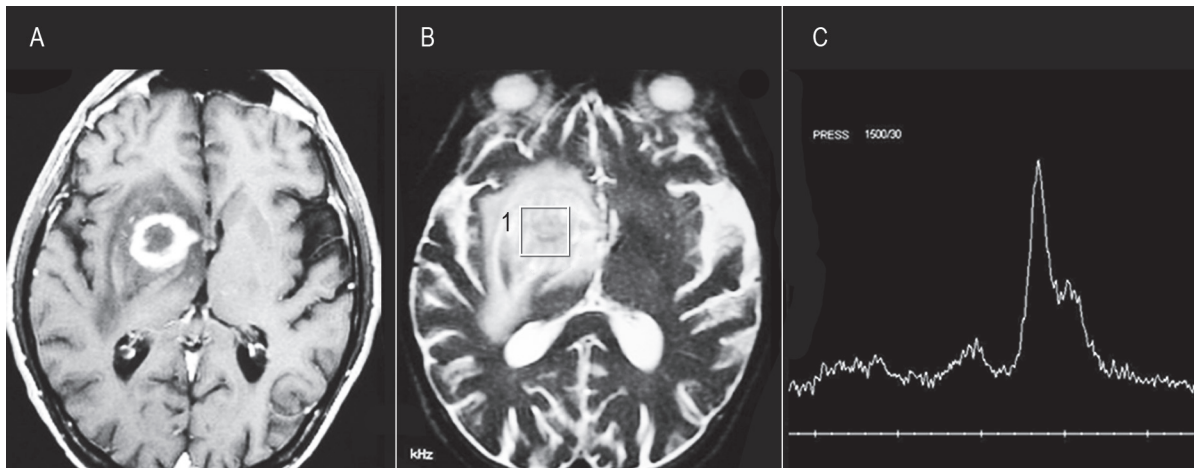
Figura 1 – Toxoplasmose cerebral: lesões anelares após uso de contraste

A – Múltiplas lesões de realce anelar distribuídas em córtex e junção córtex-substância branca de ambos os hemisférios cerebrais e em núcleos da base à direita com de edema circunjacente. B – Pequena contrastação nodular excêntrica à lesão (seta) na região justa silviana à direita (sinal do 'alvo excêntrico').

Figura 2 – Toxoplasmose cerebral em pacientes com Aids: estudo de perfusão para diagnóstico diferencial com metástases tumorais

A – Neurotoxoplasmose em paciente com Aids; múltiplas lesões com realce anelar e sinal de 'alvo excêntrico'.

B – Estudo de perfusão cerebral em que se observa a redução do volume sanguíneo cerebral associado às lesões, consistente com processo inflamatório, importante para o diagnóstico diferencial com metástases.

Os processos expansivos que geram maior dificuldade para o diagnóstico diferencial são os linfomas, tumores cerebrais mais comuns nos pacientes com Aids (20% a 30%), e os gliomas de baixo e elevado graus de malignidade. Comportam-se como massas intracranianas em geral únicas, cujo diagnóstico rápido e preciso, como se pode antever, é de extrema importância para a conduta. Em alterações inflamatórias por toxoplasmose que comumente surgem com lesões múltiplas, o diagnóstico diferencial precoce com metástases neoplásicas favorece o uso adequado da medicação antimicrobiana; desta forma, com a oportunidade do tratamento, as imagens observadas na RNM poderão estar sensivelmente modificadas num período de até dez dias (Roberts, Boyer & McLeod, 2004).

Ainda com relação ao emprego da RNM, os estudos por espectroscopia podem encaminhar e permitir o diagnóstico diferencial (Figura 3). Na espectroscopia, observa-se que a colina (Cho), importante constituinte das membranas celulares, se eleva quando ocorre aumento da síntese celular e conversão para células cancerígenas, enquanto a creatinina (Cr) permanece estável. Já o N-acetil-aspartato (Naa) é encontrado nos neurônios normais e fica alterado tanto em tumores quanto em lesões inflamatórias, sinalizando perda neuronal.

Figura 3 – Toxoplasmose cerebral: espectroscopia associada para diagnóstico diferencial das lesões encefálicas

A – Imagem com realce anelar em região lentículo-capsular direita circundada por edema e com efeito de massa associado. B – Localização do voxel de espectroscopia que inclui a lesão. C – Gráfico correspondente à espectroscopia que mostra picos de elevada amplitude na frequência de ressonância de lípides móveis e lactato e ausência dos demais metabólitos normais do espectro; o conjunto é indicativo de necrose.

Os estudos por espectroscopia das relações Cho/Cr e Naa/Cr podem ser úteis no diagnóstico diferencial entre lesões inflamatórias e neoplásicas, embora nem sempre categóricos, principalmente nos casos de linfoma. Nos casos de gliomas, por sua vez, esse método mostra-se útil naquela distinção, mais especialmente nos tumores de alto grau quando as relações Cho/Cr e Naa/Cr mostram cifras mais evidentes, indicando ser este um procedimento que permite o esclarecimento diagnóstico e o planejamento da conduta terapêutica (Ferraz-Filho *et al.*, 2009).

A tomografia por emissão de pósitrons (PET Scan), que permite o estudo da atividade metabólica neuronal regional com o emprego de glicose radioativa, pode também contribuir para o diagnóstico diferencial da TE e das neoplasias.

Além das patologias já referidas, o diagnóstico diferencial da TE inclui também a leucoencefalopatia multifocal progressiva, tumores gliais e infecções por outros microrganismos.

TRATAMENTO

O tratamento da toxoplasmose na criança é realizado por meio de agentes antimicrobianos e deve ajustar-se às condições clínicas e de imunidade (MacLeod & Remington, 1995; Remington, McLeod & Desmonts, 2000).

Nas crianças imunocompetentes, quando se observa somente linfadenopatia, não há recomendação terapêutica mais específica. Quando passa a haver comprometimento significativo de um órgão – implicando riscos maiores –, estão indicadas as drogas tradicionais:

- pirimetamina: dose de ataque de 2 mg/kg/dia (máximo de 50 mg) por dois dias; manutenção de 1 mg/kg/dia (máximo de 25 mg);
- sulfadiazina: dose de 100 mg/kg/dia, dividida em duas doses diárias (máximo de 4 g/dia);
- leucovorina (ácido folínico): 5 mg a 20 mg, três vezes por semana.

O esquema é mantido geralmente por quatro a seis semanas ou por duas semanas após a resolução do quadro clínico.

Nas crianças imunocomprometidas não portadoras de Aids que apresentam toxoplasmose, o esquema medicamentoso será o mesmo descrito anteriormente, mantido por quatro a seis semanas até a completa regressão das manifestações clínicas em que o tratamento continuado de base depende de imunossupressão.

Nas crianças com Aids, por sua vez, o esquema anteriormente proposto também está indicado, pelo mesmo período e à espera de que a contagem dos linfócitos T CD4 seja maior que $200/mm^3$.

A pirimetamina possui efeito sinérgico quando associada à sulfadiazina. As reações tóxicas incluem depressão reversível da medula óssea, neutropenia, descoloração dentária, reações alérgicas, alterações hepáticas e anemia aplástica.

Como foi dito, a associação com a sulfadiazina tem boa ação sinérgica. Como possíveis efeitos adversos, verificam-se alterações de hipersensibilidade, hepatotoxicidade e depressão da medula óssea. Orienta-se para uma boa hidratação da criança para evitar a cristalúria.

A pirimetamina leva a uma depleção do ácido folínico, cuja finalidade é favorecer a síntese de ácidos nucleicos pelas células da criança. Por isso, o ácido folínico deve sempre ser usado durante o tratamento com a pirimetamina, sendo mantido pelo período de uma semana quando essa droga for retirada.

PROGNÓSTICO

O prognóstico da doença depende do quadro clínico e das condições imunitárias da criança. Nas crianças imunocompetentes, como já se viu, em que somente se observa linfadenopatia, febre e desconforto geral, o prognóstico é relativamente bom, embora este contexto possa estender-se por vários meses. Nos casos mais complicados, com acometimento de órgãos importantes e manifestações clínicas mais significativas, verifica-se uma melhora sensível após algumas semanas de tratamento medicamentoso.

Nos casos de crianças imunocomprometidas, quando o diagnóstico é precoce, o esquema conjunto com as três drogas (pirimetamina, sulfadiazina e leucovorina) costuma produzir boa resposta clínica, com resolução dos sinais e sintomas. Se houver lesão importante de algum órgão, pode ser observada alguma sequela funcional.

Nas crianças submetidas a tratamento com drogas imunossupressoras, como corticoides para tratamento de neoplasias, transplantes e doenças autoimunes, consegue-se um bom resultado com as drogas recomendadas para

terapêutica da toxoplasmose. Nos transplantes de medula óssea, em virtude da dificuldade diagnóstica decorrente da interferência nas reações sorológicas, observam-se casos de evolução fulminante.

A resolução completa e mesmo a diminuição da possibilidade de recorrência são mais prováveis se os medicamentos imunossupressores tiverem suas doses reduzidas ou se forem suspensos. Recomenda-se vigilância permanente desses indivíduos, devendo o tratamento para a toxoplasmose ser reinstituído se as manifestações da infecção retornarem.

Crianças com Aids têm prognóstico mais reservado, mesmo com tratamento, se a contagem dos linfócitos T CD4 for de 100/mm^3 a 200/mm^3.

PREVENÇÃO

Não existe, no momento, uma vacina indicada para o tratamento profilático da toxoplasmose em humanos.

Indivíduos que são imunocomprometidos por HIV e apresentam encefalite por toxoplasma ou evidência de infecção sugerida por contagem de linfócitos T CD4 menor que 200/mm^3 e anticorpos plasmáticos específicos para *T. gondii* devem receber o tratamento medicamentoso profilático.

Certamente, obter-se-á uma redução dos casos de toxoplasmose por meio de campanhas que procurem esclarecer a população sobre a doença, seus vetores de disseminação e os cuidados profiláticos para evitá-la. Além disso, é importante que os profissionais da área da saúde que trabalham no atendimento primário recebam periodicamente informações sobre a doença e seus riscos, para que faça parte do seu elenco de investigações no contato e avaliação de crianças.

REFERÊNCIAS

AMATO NETO, V.; SILVA, Y. K. O. & KONICHI, S. R. A febre como manifestação clínica da toxoplasmose adquirida, forma linfoglandular. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 7: 219, 1973.

BELMAN, A. Pediatrics Aids: neurologic manifestations. *In*: CHILD NEUROLOGY SYMPOSIUM, 1987, San Diego. *Anais...* Austin: Medical Microbiology, University of Texas, 1987. (5. ed.).

BLADER, I. J.; MANGER, I. D. & BOOTHROYD, J. C. Microarray analysis reveals previously unknown changes in *Toxoplasma gondii* infected human cells. *Journal of Biological Chemistry*, 27: 24.223-24.231, 2001.

CARRUTHERS, V. B. & SUZUKI, Y. Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. *Schizophrenia Bulletin*, 33: 745-751, 2007.

COLOMBO, F. A. *et al*. Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in Aids patients in Brazil: importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 5.044-5.047, 2005.

DUBEY, J. P. Sources of *Toxoplasma gondii* in pregnancy. *British Medical Journal*, 321: 127-128, 2000.

DUPOUY-CAMET, J. *et al*. Detection of *Toxoplasma gondii* in venous blood from Aids patients by polymerase reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 1.866-1.869, 1993.

FERRAZ-FILHO, J. R. L. *et al*. Application of magnetic resonance spectroscopy in the differentiation of high-grade brain neoplasm and inflammatory brain lesions. *Arquivos de Neuropsiquiatria*, 67(2A): 250-253, 2009.

FLEGR, J. Effects of *Toxoplasma* on human behavior. *Schizophr Bull*, 33(3): 757-760, 2007.

FRANCISCO, F. M. *et al*. Seroprevalence of toxoplasmosis in a low-income community in São Paulo Municipality, SP, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 48: 167-170, 2006.

LAMBERT, H. *et al*. Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. *Cell Microbiology*, 8: 1.611-1.623, 2006.

McLEOD, R. & REMINGTON, J. S. Toxoplasmosis. *In*: BEHRMAN, R. L.; KLIEGMAN, R. & JENSON, H. *Nelson's Textbook of Pediatrics*. 17. ed. Philadelphia: WB Saunders, 1995.

MOURA, L. *et al*. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emergency Infectious Diseases*, 12: 326-329, 2006.

REMINGTON, J. S.; McLEOD, R. & DESMONTS, G. Toxoplasmosis. *In*: REMINGTON, J. S. & KLEIN, J. O. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn*. 5. ed. Philadelphia: WB Saunders, 2000.

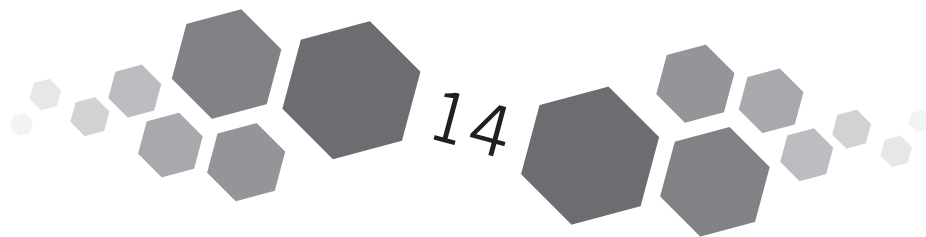
ROBERTS, F.; BOYER, K. & McLEOD, R. Toxoplasmosis. *In*: GERSHAN, A. A.; HOTEZ, P. J. & KATZ, S. L. *Krugman's Infectious Diseases of Children*. 11. ed. Philadelphia: Mosby, 2004.

SANCHEZ, M. *et al*. Seroprevalencia de la toxoplasmosis en una población pediátrica del Municipio Mara, Estado Zulia. *Kasmera*, 36: 111-119, 2008.

SCHWARTZMAN, J. D. Quantitative comparison of infection of neural cell and fibroblast monolayers by two strains of *Toxoplasma gondii*. *Procedures Society Experimental Biology Medice*, 186: 75-78, 1987.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R. & WEISS. L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal Parasitology*, 30: 1.217-1.258, 2000.

TEUTSCH, S. M. *et al*. Epidemic toxoplasmosis associated with infected cats. *New England Journal of Medicine*, 300: 695-699, 1979.

TOWNSEND, J. J. *et al*. Acquired toxoplasmosis. *Archives of Neurology*, 32: 335, 1975.

Toxoplasmose Ocular

Cristina Muccioli • Cláudio Silveira • Rubens Belfort Jr.

A toxoplasmose é tradicionalmente uma das causas mais importantes de uveítes em várias partes do mundo. No Brasil, a toxoplasmose ocular é responsável por aproximadamente 50% do total de uveítes. Na faixa etária até os 16 anos, particularmente, 46,39% das uveítes são posteriores, e a toxoplasmose é responsável por 31,44% do total dos casos. Representa 60%-85% dos casos de uveíte posterior no Brasil e 25% nos Estados Unidos e na França. A prevalência de lesões compatíveis com toxoplasmose ocular não está bem determinada, mas a presença de cicatrizes retinianas varia entre 0,6% e 2% nos Estados Unidos (Commodaro *et al.*, 2009).

A prevalência de infecção por *Toxoplasma gondii* aumenta com a idade, na mesma proporção que a incidência de retinocoroidite, mais frequentemente na segunda e terceira décadas da vida. Isso pode estar relacionado a fatores imunológicos, bem como ao fato de a maioria das infecções ocorrer na infância e pela maior probabilidade de a primeira lesão ocular surgir nos dez anos seguintes à infecção (Holland, 2003).

No Brasil, de acordo com várias publicações, a frequência de cicatrizes maculares varia cerca de 7% em São Paulo (Abreu, Hirata & Belfort, 1980; Muller, 1987), e Belo Horizonte a 12% no Espírito Santo (Holland, 2003) e 17,7% na região de Erechim (Glasner *et al.*, 1992). A prevalência da lesão ocular é mais alta em regiões tropicais e é relativamente baixa em áreas áridas e em regiões frias (Arevalo *et al.*, 2010; Soheilian *et al.*, 2004; Baruzzi, 1966).

O toxoplasma atinge o olho pelo sangue e, em imunocompetentes, a primeira lesão ocular é autolimitada e frequentemente assintomática. Acredita-se que cistos latentes nos músculos, bem como no sistema nervoso central (Bossi *et al.*, 1998), na retina e em outros focos, podem reativar-se anos após a infecção, levando a novas lesões retinocoroidianas (Holland *et al.*, 1996).

A lesão característica da toxoplasmose ocular é a retinocoroidite necrosante focal, unilateral, granulomatosa e exsudativa, com envolvimento vítreo e da câmara anterior ocular, com presença de anticorpos circulantes de classe IgG para toxoplasmose. Nos pacientes imunodeprimidos, as características clínicas podem ser atípicas, bem como na toxoplasmose adquirida recente (Holland *et al.*, 1996).

EPIDEMIOLOGIA OCULAR

Classicamente, as mulheres podem transmitir a doença ocular para o feto apenas quando infectadas pela primeira vez, meses antes ou durante a gravidez, ou se estiverem gravemente imunocomprometidas. Após esse período, os fetos de gestações seguintes ficariam protegidos da doença congênita (Commodaro *et al*., 2009). Porém, trabalhos recentes têm mostrado exceções, talvez relacionadas à reinfecção com cepas diferentes. (Commodaro *et al*., 2009)

Em relação à infecção ocular, acredita-se também que a principal via é a oral, pela ingestão de carne com cistos e água ou material contaminado com oocistos de fezes de gato (Balasundaram *et al*., 2010; Bowie *et al*., 1997). Nestes últimos casos, talvez as infecções oculares sejam mais graves. Acredita-se, também, que a severidade da infecção ocular seja maior em idosos e com inóculos maiores (Nussenblatt, Whitcup & Palestine, 1996).

Estudos realizados no Brasil, e mais tarde confirmados em outros países, mostraram que grande parte dos casos oculares são secundários à infecção adquirida pós-natal, sendo muito provável que a história natural da toxoplasmose ocular dependa de aspectos relacionados ao parasita – por exemplo, tipo de cepas, tamanho e composição do inóculo etc. –, ao hospedeiro – idade, frequência das infecções e estado imunológico – e a fatores ambientais – tempo, umidade etc. (Silveira *et al*., 1988; Beneson *et al*., 1982; Howe & Sibley, 1995, Howe *et al*., 1997; Grigg *et al*., 2001; Sibley & Boothroyd, 1992).

As infecções adquiridas por *T. gondii* em crianças e adultos imunocompetentes usualmente não apresentam manifestações oculares e, durante o estágio agudo da infecção, até 10% dos pacientes podem desenvolver lesões oculares transitórias, leves e não percebidas e 3% dos casos apresentam lesão típica e sintomas (Commodaro *et al*., 2009).

Não há explicação para a discrepância frequente de lesão ocular em populações distintas que têm taxa de positividade sanguínea semelhante. Um exemplo é a maior frequência de toxoplasmose ocular na população brasileira, apesar da frequência semelhante a de outros países – na população com sorologia positiva para toxoplasmose. Entre as hipóteses explicativas, inclui-se idade, duração e intensidade de exposição, diferenças genéticas na população hospedeira e no parasita, ou cofatores que podem afetar o curso da doença (Grigg *et al*., 2001).

Estima-se que de 70% a 90% dos pacientes com toxoplasmose congênita e de 10% a 12% de pacientes com infecção pós-natal desenvolvem a doença ocular sempre em forma de retinocoroidite. Em raríssimos casos, como em pacientes com Aids, observou-se a presença de parasitas na íris (Abreu, Belfort & Hirata, 1982; Muccioli & Belfort, 1999).

A existência de cepas de toxoplasma com patogenicidade diferente para diversos órgãos pode ajudar a explicar a variabilidade clínica, bem como a diferente história natural em pacientes e populações (Vallochi *et al*., 2008; Vaudaux *et al*., 2010; Bottós *et al*., 2009).

Acreditava-se que a toxoplasmose ocular sempre resultava de infecções congênitas. Estudos inicialmente realizados na cidade de Erechim (sul do Brasil) modificaram os conceitos tradicionais sobre a epidemiologia e patogênese da doença ocular. Identificaram-se várias famílias, em que muitos irmãos não gêmeos apresentavam toxoplasmose ocular, indicando doença ocular relacionada com a infecção adquirida (Silveira *et al*., 2001; Silveira *et al*., 2002).

Assim, a lesão ocular pode ser classificada como sendo causada por infecções congênitas ou adquiridas, simultâneas, recentes ou antigas em relação à contaminação (Muccioli, Belfort & Abreu, 2001).

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

A toxoplasmose causa retinite, e logo acomete a coroide (retinocoroidite) e o vítreo. A lesão é focal e granulomatosa, e a inflamação atinge também a úvea anterior (íris e corpo ciliar) causando tipicamente iridociclite, também granulomatosa e com precipitados ceráticos (infiltrados de células inflamatórias aderidos à face posterior da córnea). Pode levar a sinequias posteriores, pela aderência inflamatória da íris ao cristalino (Holland, 2003).

Na toxoplasmose recentemente adquirida e em atividade, embora raramente, é possível ocorrer inflamação da câmara anterior (uveíte anterior), vitreíte ou vasculite na ausência de lesão de retinocoroidite (Holland *et al*., 1999).

Dependendo do local retiniano afetado e da intensidade inflamatória, surgem sintomas e sinais que podem ser mínimos, médios ou severos, com perda visual e cegueira (Holland & Lewis, 2002) (Quadros 1, 2, 3).

Quadro 1 – Sintomas usuais de apresentação da toxoplasmose ocular

Crianças	Baixa de acuidade visual, estrabismo, nistagmo, leucocoria (diagnóstico tardio)
Adolescentes e adultos	Baixa capacidade de visão, embaçamento visual, opacidades no campo visual, fotofobia, hiperemia e dor

Quadro 2 – Sinais usuais da toxoplasmose ocular

Lesão ativa	Exsudato retiniano branco-amarelado, com limites mal definidos, coroidite subjacente e vitreíte. Precipitados ceráticos granulomatosos do tipo *mutton fat*, congestão ciliar, hipertensão ocular transitória, sinequias posteriores
Lesão em regressão	Melhora e desaparecimento da uveíte anterior Margens das lesões mais nítidas Diminuição da exsudação e vitreíte
Lesão cicatrizada	Retinocoroidite com margem bem delimitada Atrofia retinocoroidiana e hiperpigmentação e hipopigmentação tardias Desaparecimento da inflamação

Quadro 3 – Formas clínicas de toxoplasmose ocular

Retinocoroidite focal ativa	Unilateral, exceto na Aids e em estados de imunossupressão Lesões variam, em tamanho, desde pequenas e puntiformes, até atingir dois quadrantes da retina Lesões ovais ou circulares e raramente difusas Retinocoroidite focal, necrosante, granulomatosa, branco-amarelada ou acinzentada Reação vítrea
Neurorretinite	Retinite adjacente à papila
Vasculite	Geralmente próxima à lesão ativa
Vitreíte	Exsudação proteica e infiltração celular com opacificação e fibrose
Iridociclite	Secundária à lesão retiniana Geralmente granulomatosa, com precipitados ceráticos do tipo *mutton fat* Sinequias posteriores, células e *flare* no humor aquoso Raramente, iridociclite ativa crônica, heterocromia da íris e quadro de ciclite heterocrômica de Fuchs com retinocoroidite cicatrizada

QUADRO CLÍNICO DA TOXOPLASMOSE OCULAR

As crianças com toxoplasmose que ainda não se expressam verbalmente são frequentemente encaminhadas ao oftalmologista pelos professores ou pais que notam baixa visual, estrabismo, nistagmo ou leucocoria, pois muitas vezes não há sintomas ou sinais. Costumam decorrer da forma congênita e não apresentam sintomas ou sinais extraoculares, mas podem ocorrer crises oculares desde os primeiros meses e por décadas (Petrilli, 1987).

As crianças maiores e os adultos podem referir embaçamento, diminuição da visão e miiodopsia (moscas volantes). Se houver alteração no segmento anterior do olho, pode haver também fotofobia, dor e hiperemia (Remington *et al*., 2006).

Retinocoroidite Ativa

A lesão da toxoplasmose ocular ativa é a retinocoroidite granulomatosa focal necrosante. É elevada, de coloração branco-amarelada e de aspecto necrótico, com reação vítrea importante e margens mal delimitadas, por causa do edema retiniano circunjacente. Raramente a esclera se encontra comprometida (esclerite) (Commodaro *et al*., 2009).

O tamanho da lesão é variável, desde um décimo de diâmetro papilar até dois quadrantes de retina, e é frequente o achado de lesões ativas e cicatrizadas no mesmo olho ou com apresentação contralateral (Holland, 2003).

A lesão ativa evolui para a cicatrização, com progressiva delimitação e menor edema retiniano, e o tempo de cicatrização parece depender de vários fatores, entre os quais a cepa de toxoplasma, o estado imunológico do paciente, o tamanho da lesão inicial e o tratamento. Geralmente, a lesão pequena cicatriza em quatro semanas, a lesão média pode requerer alguns meses, enquanto a lesão grande pode levar mais de um ano (Dodds *et al*., 2008) (Quadro 4).

Quadro 4 – Achados clínicos da toxoplasmose ocular

• Retinocoroidite ativa focal ou difusa
• Retinocoroidite cicatrizada
• Retinocoroidite ativa satélite à lesão cicatrizada
• Envolvimento vítreo
• Iridociclite
• Vasculite
• Neurorretinite
• Neurite óptica, papilite
• Heterocromia da íris com iridociclite

Retinocoroidite Cicatrizada

As lesões cicatrizadas apresentam margens bem delimitadas, vários graus de hiperplasia do epitélio pigmentar e de destruição da retina e coroide, permitindo a visão dos vasos grandes da coroide e a esclera, quando se observa grande destruição da coroide. Pode haver gliose retiniana, vitreorretinopatia, proliferativa ou não, neovascularização

coroidiana e ou retiniana e *shunts* vasculares. A retinocoroidite toxoplásmica congênita típica é macular e em aspecto de roda de carroça, com pequenas lesões cicatrizadas à volta (Commodaro *et al*., 2009).

Retinocoroidite Satélite

É patognomônica de toxoplasmose, e se caracteriza por lesão ativa ao lado de outra(s) já cicatrizada(s). No processo de cura, os parasitas se reencistariam na margem da lesão, e posteriormente os cistos se romperiam, liberando novamente os taquizoítas e causando a reativação. Ou então a reativação seria causada pela resposta de células de memória imunológica nas margens da cicatriz e monócitos circulantes contendo parasitas ou seus antígenos (Holland, 2003).

Envolvimento Vítreo e Descolamento da Retina

A presença de células inflamatórias no vítreo anterior é constante na toxoplasmose ocular, mesmo sem comprometimento do segmento anterior ocular. A reação inflamatória vítrea, sempre presente, tem intensidade variável. A exsudação proteica e a infiltração celular a partir da retinite leva à opacificação vítrea, geralmente transitória. Pode ocorrer descolamento da membrana hialoide posterior do vítreo com colapso e precipitados celulares arredondados na face externa descolada, semelhantes aos precipitados ceráticos. Às vezes ocorre a formação de traves vítreas densas, tração vitreorretiniana e descolamento tracional da retina a partir de buracos ou diálise retiniana, principalmente em crianças. A opacificação vítrea é geralmente mais intensa, demorada e de maior patogenicidade nas recidivas, principalmente em lesões da periferia da retina (Muccioli, Belfort & Abreu, 2001).

Iridociclite Secundária

É frequente a concomitância de iridociclite, geralmente granulomatosa, com precipitados ceráticos do tipo *mutton fat*, formação de nódulos inflamatórios irianos, sinequias posteriores, células e *flare* na câmara anterior. A iridociclite em geral é transitória e um problema menor dentro do quadro, mas deve ser tratada para evitar complicações iridocristalinianas e glaucoma. Esta reação na câmara anterior é apenas secundária à retinocoroidite, uma vez que não se encontra o parasita na câmara anterior ou íris, exceto rarissimamente em pacientes com Aids (Muccioli *et al*., 1994). Na fase inicial é frequente a uveíte hipertensiva, autolimitada (Dodds *et al*., 2008).

Vasculite

A vasculite (flebite ou arterite) costuma ser próxima à lesão, mas pode também ser difusa. A flebite é mais frequente, inclui edema retiniano, embainhamento venoso, exsudato e hemorragia retiniana, obstrução venosa e, eventualmente, hemorragia vítrea. A arterite mostra placas esbranquiçadas sobre a artéria (arterite segmentar), alterações no calibre, retificação e diminuição da luz arteriolar (Holland *et al*., 1996).

Neurorretinite

Ocorre quando a retinocoroidite está adjacente à papila, causando um defeito de campo visual que se estende da mancha cega para a periferia, em forma crescente. Antigamente, esta lesão justapapilar era atribuída à tuberculose e chamada de coroidite ou retinocoroidite de Jensen. A toxoplasmose é a principal causa (Holland *et al*., 1996).

O aspecto da lesão nos primeiros dias, muitas vezes, é de papilite pura, com queda variável da visão, edema de papila, hiperemia, ingurgitamento venoso, hemorragias superficiais e envolvimento vítreo variável. Após alguns

dias, o foco de retinocoroidite aguda se torna evidente, próximo à papila, bem como, às vezes, lesão hiperpigmentada antiga (Holland *et al*., 1996).

Neurite Óptica, Papilite

A toxoplasmose parece ser causa de papilite sem retinocoroidite e neurite, realçando a importância da associação entre toxoplasmose do sistema nervoso central e a forma ocular (Holland *et al*., 1996).

Heterocromia de Íris

A associação entre toxoplasmose e ciclite heterocrômica de Fuchs, relatada inicialmente no Brasil (1982), foi posteriormente confirmada na Europa e nos Estados Unidos (Abreu, Belfort & Hirata, 1982).

O intervalo de tempo entre a toxoplasmose e a ciclite heterocrômica de Fuchs é variável, mas a retinocoroidite geralmente antecede a ciclite em meses, até anos. Em ambos os olhos podem-se observar lesões compatíveis com toxoplasmose e recidivas. A ciclite é quase sempre unilateral, e as lesões de toxoplasmose inativas (Abreu, Belfort & Hirata, 1982).

Pacientes de íris clara desenvolvem heterocromia, enquanto os de íris castanha mostram apenas as outras características da síndrome (Abreu, Belfort & Hirata, 1982).

TOXOPLASMOSE OCULAR NA AIDS

Em circunstâncias especiais, como na infecção pelo HIV e na síndrome de imunodeficiência adquirida, a toxoplasmose ocular e a reativação de antigas lesões toxoplásmicas podem tomar aspectos diferentes, e a retinite difusa e ativa passa a ser frequente em ambos os olhos (Muccioli & Belfort, 1999).

A toxoplasmose acomete paciente HIV-positivo mesmo com contagem de linfócitos T CD4 acima de 300 células/mm^3 e sem sinais clínicos evidentes de Aids (Muccioli *et al*., 1994).

FORMAS DA TOXOPLASMOSE OCULAR EM RELAÇÃO À ÉPOCA DA INFECÇÃO

A toxoplasmose ocular pode ser classificada nas formas congênita (precoce ou tardia) e adquirida (precoce ou tardia) e, portanto, existem quatro formas de toxoplasmose ocular (Holland *et al*., 1996) (Quadro 5).

Quadro 5 – Formas de toxoplasmose ocular

Formas de toxoplasmose ocular
Congênita a) precoce: ocular pura ocular + sistêmica + comprometimento do sistema nervoso central b) tardia: ocular pura
Adquirida a) precoce: concomitante à infecção ocular pura ou não b) tardia: ocular pura

Toxoplasmose Congênita

A toxoplasmose congênita pode ser exclusivamente ocular ou estar acompanhada de alterações sistêmicas ou do sistema nervoso central (Holland, 2003).

É resultante da infecção pré-natal e se apresenta clinicamente logo ao nascimento, ou somente nas primeiras décadas de vida. Sabin descreveu uma tétrade de sinais clínicos na toxoplasmose congênita: microcefalia ou anencefalia, calcificações cerebrais, convulsões e coriorretinite, que geralmente compromete a mácula dos dois olhos. Porém, estas manifestações são raras, pois a grande maioria é subclínica ao nascimento, e outras lesões podem ocorrer durante toda a vida (Holland, 2003).

Lesões típicas de retinocoroidite congênita estão presentes como lesões maculares, cicatrizadas, com depósito radial de pigmento ao redor da área central necrótica, levando ao aspecto de 'roda de carroça' (Holland, 2003).

A forma ocular congênita pode ter, portanto, apresentação neonatal ou tardia, mais comumente na segunda ou terceira décadas de vida (Holland *et al*., 1996).

Toxoplasmose congênita de aparecimento tardio

A toxoplasmose congênita tardia também decorre da infecção pré-natal. O único comprometimento é o ocular. Pode haver alterações neurológicas ou psiquiátricas, às vezes subclínicas. As lesões surgem frequentemente a partir da primeira e segunda décadas de vida, acompanhadas de sorologia positiva residual (baixa). Por ocasião da infecção intrauterina, alguns cistos permaneceriam em focos, inclusive na retina, inicialmente inativos, levando a quadros de ativação das lesões (Silveira *et al*., 2003).

Toxoplasmose Adquirida

A toxoplasmose adquirida é geralmente assintomática e acomete os olhos na sua fase aguda em até 10% dos casos, mas a grande maioria é leve, transitória e frequentemente despercebida, principalmente em crianças e adultos jovens (Nussenblatt, Whitcup & Palestine, 1996).

Posteriormente, meses a anos depois da primoinfecção, aparecem formas oculares clinicamente importantes e, nesta fase, é impossível estabelecer a diferenciação laboratorial e clínica com formas congênitas (Silveira *et al*., 2011).

A toxoplasmose congênita acomete geralmente ambos os olhos, e a adquirida somente um. As lesões ativas costumam ser solitárias, e satélites à cicatriz. Em mais de 50% dos casos as lesões estão localizadas no polo posterior. Raramente as lesões ativas são multifocais em um olho ou bilaterais, e quando ocorrem, deve-se suspeitar sempre de Aids, tumores etc. O mesmo se aplica a lesões difusas em vez de focais (Commodaro *et al*., 2009).

Recidiva da lesão retiniana ocorre tanto na forma congênita quanto na adquirida. Tipicamente, as recidivas se manifestam como lesões satélites e estão localizadas na borda de uma cicatriz de retinocoroidite preexistente. Em alguns pacientes, podem-se observar lesões novas, longe de lesões prévias, cicatrizadas, de retinocoroidite (Commodaro *et al*., 2009).

A perda visual decorrente da toxoplasmose é causada pela destruição retiniana na mácula, no feixe papilomacular por ocasião da primeira crise, mas também pelas recidivas que podem ocorrer depois de meses ou muitos anos e as complicações vitreorretinianas, como o descolamento de retina. Isso é particularmente grave na criança que não se expressa verbalmente e que não tem condições de perceber e comunicar os sintomas, a fim de adotar-se o tratamento clínico e cirúrgico adequado (Petrilli, 1987).

DIAGNÓSTICO DA TOXOPLASMOSE OCULAR

O diagnóstico da retinocoroidite toxoplásmica é baseado na apresentação clínica, na exclusão de diagnósticos diferenciais e na comprovação de infecção pelo toxoplasma, geralmente pelo achado de anticorpos circulantes específicos. Testes diagnósticos invasivos, como biópsia de retina, não são indicados, a não ser em casos especiais, em virtude dos sérios riscos relacionados aos procedimentos (Commodaro *et al*., 2009).

O exame da reação em cadeia da polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*) no humor aquoso vem ganhando importância apesar de ser um procedimento invasivo e não ter tanta sensibilidade quanto a PCR realizada no vítreo (Matos *et al*., 2007; De Boer *et al*., 1996).

Diagnóstico Laboratorial

Testes sorológicos servem para confirmar a exposição anterior a *T .gondii*, e é impróprio confirmar o diagnóstico de toxoplasmose ocular apenas pela presença de anticorpos (Garcia *et al*., 1999).

Os valores de anticorpos séricos não têm relação com a toxoplasmose ocular. Como as lesões retinianas ocorrem muitos anos após a infecção, os títulos sorológicos de IgG podem estar baixos, e IgM ausente.

A persistência de níveis sorológicos altos de IgG para toxoplasmose observada em muitos pacientes pode indicar persistência de infecção crônica ou reinfecção e relação com recidivas oculares.

A demonstração da produção local de anticorpos no olho como evidência diagnóstica de toxoplasmose ocular é possível mediante a comparação entre a concentração de anticorpos específicos e não específicos no humor aquoso e no sangue. Porém, este exame não é realizado rotineiramente e apresenta várias limitações, de acordo com o quadro clínico ocular e com os níveis de anticorpos circulantes (Commodaro *et al*., 2009).

A PCR é um teste diagnóstico capaz de determinar o agente infeccioso e não a resposta à infecção pela presença de anticorpos. Trata-se de teste altamente sensível e específico, que deve ser feito sob rigorosa técnica para evitar falsos resultados. Geralmente é usada para analisar fluidos oculares como humor aquoso e humor vítreo, materiais provenientes de biópsias vitreorretinianas, além de sangue e plasma. O exame de PCR ainda não é usado rotineiramente e está reservado para os casos atípicos (Silveira *et al.*, 2003).

A PCR no sangue é pouco específica, e não se correlaciona com a atividade da lesão ocular. Por sua vez, a PCR no vítreo é mais sensível, porém mais trabalhosa e com maior risco de iatrogenia do que a PCR no humor aquoso. De todo modo, ambas podem ajudar o diagnóstico diferencial com outras infecções (Rothova *et al*., 2008).

As próximas etapas em desenvolvimento, particularmente a genotipagem e a sorotipagem, podem ajudar a caracterizar classicamente diferentes cepas e resistências ao tratamento nos pacientes (Holland, 2000).

Exame Oftalmológico na Toxoplasmose Ocular

O exame oftalmológico na toxoplasmose ocular se inicia pela história que analisa crises anteriores, informação sobre toxoplasmose adquirida ou congênita, doenças associadas à imunossupressão, outras infecções e doenças etc. (Muccioli, Belfort & Abreu, 2001).

Deve-se perguntar sobre o acometimento em cada crise, tratamento usado, duração, resposta e comparação com a crise atual. Perguntar sobre dor, baixa visual progressiva ou não, opacidades (sujeiras) no campo visual e fotofobia (Muccioli, Belfort & Abreu, 2001).

A visão deve ser avaliada, após correção com óculos para cada olho, bem como a visão de cores. A ectoscopia deve avaliar nistagmo, musculatura extrínseca ocular e reações de pupila. Deve-se medir a pressão intraocular e, em seguida, proceder – sempre em ambos os olhos – à oftalmoscopia binocular indireta e biomicroscopia do segmento posterior com lente. Os resultados devem ser adequadamente registrados (Muccioli, Belfort & Abreu, 2001).

Ao exame de fundo de olho, é comum observar lesão branco-amarelada, frequentemente próxima à cicatriz de retinocoroidite antiga. O local preferencial de acometimento é o polo posterior e, quando próximas ao nervo óptico, as lesões podem ser confundidas com papilite. Os vasos retinianos podem apresentar perivasculite, e opacidades vítreas estão geralmente presentes.

Lesões ativas, quando acompanhadas por reação vítrea inflamatória intensa, apresentam a aparência clássica de 'lanterna na neblina'. A coroide é secundariamente afetada, mas as lesões da coroide não ocorrem na ausência da infecção retiniana (Muccioli, Belfort & Abreu, 2001).

Pacientes com toxoplasmose adquirida podem desenvolver lesões oculares atípicas (retinite expressa como esbranquiçamento tênue e localizado na retina) ou vasculite, vitreíte, uveíte anterior, sem o desenvolvimento de uma lesão de retinocoroidite focal necrosante.

Há formas atípicas como a *puntata externa* em que a retina profunda é afetada e caracterizada por múltiplas pequenas lesões na periferia.

Alguns exames oftalmológicos complementares podem ser empregados, mas são mais úteis para diagnóstico de complicações do que para a determinação da doença. São eles:

- Retinografia – a documentação fotográfica da retina deve incluir tanto a área da lesão ativa quanto o restante da retina, para documentar outras lesões e permitir acompanhamento de novas recidivas ou complicações.
- Tomografia de coerência óptica (OCT) – significante ajuda para o clínico. Aumenta a visualização da inflamação na retina e no vítreo, além de detectar complicações como edema e buraco macular. Também é útil para identificar e acompanhar membranas epirretinianas e neovasculares.
- Angiofluoresceinografia – antes da OCT era mais solicitada para diagnosticar complicações, como edema macular cistoide, tração vitreorretiniana e buraco macular. Segue útil para diagnóstico de vasculites e alterações vasculares como obstruções venosas ou arteriais, *shunts* arteriovenosos e neovascularização retiniana ou de coroide.
- Ultrassonografia – pode ser útil para identificar descolamento do corpo ciliar e quando o exame da retina é difícil ou impossível por causa de sinequia posterior, catarata ou opacificação corniana e vítrea. Identifica complicações como descolamento retiniano e de coroide, hemorragia ou opacidades e tração vitreorretiniana.
- Angiografia com indocianina verde (ICG) – não é útil no diagnóstico ou no tratamento da toxoplasmose ocular, mas pode ajudar a avaliação da extensão do envolvimento da coroide.

Diagnóstico Diferencial

O diagnóstico diferencial deve ser realizado com doenças infecciosas e não infecciosas e de acordo com a faixa etária do paciente (Muccioli, Belfort & Abreu, 2001).

Lesões oculares em recém-nascidos devem ser diferenciadas de outras infecções congênitas, como rubéola, infecção por citomegalovírus, herpes simples, sífilis e tuberculose. Outras doenças importantes e não infecciosas a serem consideradas no diagnóstico diferencial do recém-nascido incluem coloboma, vítreo primário hiperplásico, retinopatia

do prematuro e retinoblastoma. No adulto, mencionem-se sífilis, tuberculose, herpes, infecção por citomegalovírus, atrofias e degenerações de retina, entre outras.

Lesões recidivantes adjacentes a lesões de retinocoroidite podem lembrar outros tipos de uveíte como coroidite serpiginosa. Outros diagnósticos diferenciais importantes incluem necrose aguda de retina, retinite fúngica, retinite séptica, endoftalmite e toxocaríase ocular (Quadro 6).

Quadro 6 – Principais diagnósticos diferenciais de toxoplasmose ocular

EM RECÉM-NASCIDOS	
Doenças infecciosas	Doenças não infecciosas
• Rubéola	• Coloboma de retina e coroide
• Infecção por citomegalovírus	• Persistência de vítreo primário hiperplástico
• Sífilis	• Retinoblastoma
• Herpes simples	• Retinopatia do prematuro
• Tuberculose	
EM CRIANÇAS E ADULTOS	
Doenças infecciosas	Doenças não infecciosas
• Sífilis	• Coloboma
• Tuberculose	• Degeneração viteliforme de mácula
• Necrose retiniana aguda	• Atrofia girata
• Candidíase	• Membrana vascular retiniana
• Infecção por citomegalovirus (na Aids)	• Coroidite geográfica e/ou serpiginosa
• Toxocaríase	• Fibras de mielina
• Cisticercose	• Hemorragia (trauma)
• Paracoccidioidomicose	• Tumor
• Rubéola	• Membrana neovascular
	• Sarcoidose

COMPLICAÇÕES DA TOXOPLASMOSE OCULAR

Entre as complicações da toxoplasmose ocular, inclui-se edema de mácula, descolamento de retina, glaucoma, opacidades ou hemorragias vítreas, hemorragia retiniana, oclusão vascular, neovascularização sub-retiniana e membrana epirretiniana. Essas intercorrências são mais comuns nos casos mais graves e são causas importantes de morbidade (Commodaro *et al.*, 2009) (Quadro 7).

Quadro 7 – Complicações da toxoplasmose ocular

Organização vítrea
Descolamento de retina e tração vitreorretiniana
Maculopatia (edema, tração)
Hemorragia vítrea e oclusão vascular
Catarata
Glaucoma
Ambliopia (em crianças)

Organização Vítrea

O envolvimento vítreo é a regra na toxoplasmose ocular, em que se observa transudação proteica e infiltração celular. A extensão do comprometimento é variável e geralmente depende do tamanho da lesão e das recidivas.

Na maior parte dos casos, o vítreo vai se normalizando conforme a lesão cicatriza e, após algumas semanas ou meses, está com transparência adequada à visão.

Algumas vezes, as opacidades vítreas persistem por mais tempo, e referidas pelo paciente como manchas ou opacidades flutuantes. Raramente, quando a opacificação vítrea é intensa e persiste por mais de seis meses, a vitrectomia pode ser necessária. Nesses casos é frequente encontrar catarata associada, bem como tração vitreorretiniana e descolamento de retina.

Descolamento de Retina

Em casos severos, o envolvimento e a opacificação vítrea formam traves vítreas, geralmente entre as lesões e os locais onde o vítreo fica mais aderido, como a papila, a mácula, a base do vítreo e os vasos retinianos. A trave vítrea traciona esses pontos de aderência vitreorretinianos e pode levar à ruptura e descolamento tracional da retina (Holland *et al.*, 1996).

O reconhecimento dessa tração e a identificação de buracos retinianos são importantes em crianças pela alta probabilidade de elas desenvolverem descolamento de retina.

Muitas vezes, está indicada a fotocoagulação ou crioterapia profilática dos locais sob tração vítrea, além de explante escleral e vitrectomia. O tratamento do descolamento de retina associado à toxoplasmose ocular é sempre cirúrgico e de urgência. Basicamente, a cirurgia consiste de vitrectomia via *pars plana*, endofotocoagulação e frequentemente injeção intraocular de gás ou óleo de silicone (Holland *et al.*, 1996).

Maculopatias (Edema e Tração)

Lesões próximas à mácula podem levar, em virtude do edema ou da tração da membrana limitante interna, à metamorfopsia e diminuição visual (Holland *et al.*, 1996).

Em casos de longa evolução, pelo edema crônico da retina circunjacente à lesão com eventual comprometimento da mácula, pode ocorrer edema cistoide macular e buraco macular (Muccioli, Belfort & Abreu, 2001).

Hemorragia Vítrea

A hemorragia vítrea na toxoplasmose pode ocorrer a partir de oclusões vasculares retinianas, ou por descolamento tracional da retina, pela avulsão dos vasos retinianos.

A hemorragia e a opacificação vítrea tendem a clarear com o tempo, definindo conduta expectante de pelo menos seis meses, salvo em casos de descolamento de retina ou tração vitreorretiniana importante. A avaliação ultrassonográfica e funcional periódica, nesses casos, é importante para orientar a conduta (Muccioli, Belfort & Abreu, 2001).

Catarata

A catarata também é frequente nos casos mais graves e decorrentes da corticoterapia, bem como nos casos associados à ciclite heterocrômica de Fuchs. A facoemulsificação com implante de lentes intraoculares tem bom prognóstico. Deve ser realizada para recuperação visual do paciente e também para possibilitar o acompanhamento das lesões de retina e o necessário tratamento (Muccioli, Belfort & Abreu, 2001).

Glaucoma

A pressão intraocular pode-se elevar transitoriamente na fase inicial da retinocoroidite toxoplásmica, se houver iridociclite. A hipertensão desaparece com midríase medicamentosa e colírios de esteroides, ou mesmo sem tratamento, e não há necessidade de medicação antiglaucomatosa. Pode ocorrer também hipotensão leve e transitória pela diminuição da produção de humor aquoso (Holland *et al.*, 1996).

O glaucoma secundário é raro na toxoplasmose ocular e pode ser causado pela corticoterapia, bem como sinequias periféricas decorrentes da iridociclite crônica ou associada ao glaucoma do tipo cônico simples (amplo aberto), de causa desconhecida, que acompanha com frequência a ciclite heterocrômica de Fuchs (Muccioli, Belfort & Abreu, 2001; Abreu, Belfort & Hirata, 1982).

Ambliopia

A ambliopia é causada por opacificação vítrea ou edema de retina transitórios na infância, o que impossibilita o desenvolvimento da mácula nos casos de toxoplasmose extramacular. Pode estar associada ao nistagmo. A oclusão do outro olho só é eficiente quando o olho a ser tratado não apresenta opacificação de meios ou lesão orgânica causadora da deficiência visual. Não está indicada, evidentemente, nos casos de lesão macular ou do nervo óptico (Muccioli, Belfort & Abreu, 2001; Holland *et al.*, 1996).

TRATAMENTO

A maioria dos casos de toxoplasmose ocular é autolimitada, mas o tratamento é quase sempre necessário para abreviar o tempo da doença, bem como diminuir a gravidade das crises, a frequência de complicações e a destruição maior da retina. O tratamento da lesão ocular é feito com agentes antitoxoplasmose, associados ou não aos corticoides sistêmicos. Não há indicação de corticoterapia sem antitoxoplásmico sistêmico na toxoplasmose ocular, pelo perigo de o corticoide isolado levar ao agravamento da infecção. O tratamento é com frequência local (com colírios) e sistêmico (por via oral). Em casos especiais, as vias de administração intravítrea e periocular podem ser usadas. Os colírios, empregados para tratar a iridociclite secundária, compõem-se de

atropina ou tropicamida (para produzir cicloplegia e evitar sinequias posteriores, além de diminuir a fotofobia e lacrimejamento) e corticoides – dexametasona ou prednisolona –, que diminuem a intensidade da inflamação e os sintomas (Commodaro *et al.*, 2009).

Recém-nascidos de mães que adquiriram toxoplasmose na gravidez devem ser tratados com medicação específica durante o primeiro ano de vida, independentemente de apresentarem lesões oculares, para evitar recidivas oculares e proteger o sistema nervoso central. Devem continuar a ser cuidadosamente seguidos (Holland, 2003).

Em adultos, algumas retinocoroidites toxoplásmicas autolimitadas e benignas, menores que um quarto de diâmetro papilar, no equador ou periferia da retina, especialmente as que se localizam no lado nasal e sem reação vítrea, podem ser apenas observadas, sem nenhuma medicação. Lesões que afetam direta ou indiretamente a visão, quer pela localização próxima à mácula, papila ou feixe papilomacular, quer pelo comprometimento vítreo, devem ser tratadas com medicamento específico e sempre corticoide (Holland, 2003).

Em vários trabalhos, tentou-se comparar a eficácia das diversas drogas disponíveis. Entretanto, nenhum deles apresenta metodologia que permita conclusões.

As drogas antitoxoplasma disponíveis têm boa ação, mas não eliminam os cistos.

Existe a impressão clínica de que o melhor tratamento específico para a toxoplasmose ocular é a associação de pirimetamina e sulfadiazina durante – pelo menos – quatro a seis semanas. A tendência atual é usar associação de sulfametoxazol com trimetoprim, por quatro a seis semanas, pela maior comodidade, adesão ao tratamento e menos reações colaterais (Grossman & Remington, 1979; Grossman, Krahenbuhl & Remington, 1978) (Quadro 8).

Quadro 8 – Tratamento da toxoplasmose ocular

• Observação clínica
• Medicação específica
• Medicação específica + corticoide sistêmico
• Colírios: midriático, cicloplégico + corticoide

A combinação de pirimetamina e sulfadiazina, considerada a terapia ‘clássica’ para toxoplasmose ocular, é considerada padrão-ouro, mas várias outras drogas também demonstraram eficácia *in vitro* e *in vivo* contra *T. gondii.* São empregadas no tratamento da toxoplasmose ocular, mas sua eficácia continua incerta (Lasave *et al.*, 2010; Opremcak, Scales & Sharpe, 1992; Nguyen & Stadtsbaeder, 1975).

Recidivas

A recidiva de toxoplasmose ocular é sempre possível, pois nenhum tratamento erradica os organismos.

Em ensaio clínico realizado no Brasil, sugeriu-se a possibilidade de tratamento prolongado com associação de sulfametoxazol e trimetoprim em posologia de um comprimido, três vezes por semana, durante pelo menos 18 meses. Essa profilaxia parece extremamente eficiente, mas seu efeito tende a desaparecer com a suspensão do tratamento, e recidivas voltam a ser mais frequentes (Silveira *et al.*, 2002).

Causas das recidivas

A causa da recidiva na toxoplasmose ocular permanece desconhecida. Há várias hipóteses:

- ruptura periódica de cistos retinianos e invasão direta da célula retiniana;
- ruptura de cistos em outros locais do organismo, relacionada a fatores imunológicos do hospedeiro ou a fatores biológicos do toxoplasma e parasitemia em monócitos que reagiriam com células e tecido da lesão retiniana anterior;
- reinfecções, com exposição de células imunocompetentes no local a antígenos, organismos vivos ou imunocomplexos e consequente ativação das lesões;
- autoimunidade a antígenos retinianos. Há muitos anos é conhecida a capacidade autoantigênica de estruturas intraoculares, atribuídas atualmente à retina pelo antígeno S;
- imunocomplexos circulantes. Pacientes com toxoplasmose têm frequentemente anticorpos circulantes, que poderiam provocar recidivas ao reagir nos locais das lesões antigas;
- Produção de *locus minoris resistentiae* a estímulos inespecíficos e outras infecções (virais, por exemplo).

Corticoterapia na Toxoplasmose Ocular

O tratamento com corticosteroides apresenta efeitos colaterais relacionados à dose e ao tempo de administração e, na toxoplasmose ocular, raramente leva a complicações.

As injeções subtenonianas de corticosteroides de liberação lenta, como depósito de triancinolona, já foram indicadas e contraindicadas, porque atingem níveis supressores dentro do olho e podem favorecer a proliferação dos parasitas. Em situações especiais, a associação de clindamicina e corticoide intravítreo foi recentemente sugerida (Soheilian *et al*., 2010).

REFERÊNCIAS

ABREU, M. T.; BELFORT JR., R. & HIRATA, P. S. Fuch's heterocromic cyclitis and ocular toxoplasmosis. *American Journal of Ophthalmology*, 93: 739-744, 1982.

ABREU, M. T.; HIRATA, P. S. & BELFORT JR., R. Uveítes em São Paulo: estudo epidemiológico, clínico e terapêutico. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, 43: 10-16, 1980.

AREVALO, J. F. *et al*. Ocular toxoplasmosis in the developing world. *International Ophthalmology Clinics*, 50(2): 57-69, 2010.

BALASUNDARAM, M. B. *et al*. Outbreak of acquired ocular toxoplasmosis involving 248 patients. *Archives of Ophthalmology*, 128(4): 508, 2010.

BARUZZI, R. G. Inquérito sorológico sumário para toxoplasmose entre índios do Parque Nacional do Xingu. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 8: 227-280, 1966.

BENESON, M. W. E. T. *et al*. Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. *The New England Journal of Medicine*, 300: 694-699, 1982.

BOSSI, P. *et al*. *Toxoplasma gondii*-associated Guillain-Barré syndrome in an immunocompetent patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(12): 3.724-3.725, 1998.

BOTTÓS, J. *et al*. *In*: BOTTÓS, J. *et al*. Bilateral retinochoroiditis caused by an atypical strain of *Toxoplasma gondii*. *The British Journal of Ophthalmology*, 93(11): 1.546-1.550, 2009.

BOWIE, W. R. A. S. *et al*. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *The Lancet*, 350: 173-177, 1997.

COMMODARO, A. G. *et al*. Ocular toxoplasmosis: an update and review of the literature. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(2): 345-350, 2009.

DE BOER, J. H. *et al*. Serologic and polymerase chain reaction analysis of intraocular fluids in the diagnosis of infectious uveitis. *American Journal of Ophthalmology*, 121(6): 650-658, 1996.

DODDS, E. M. *et al*. International ocular toxoplasmosis research group. Intraocular inflammation associated with ocular toxoplasmosis: relationships at initial examination. *American Journal of Ophthalmology*, 146(6): 856-865, 2008.

GARCIA, J. L. *et al*. Soroepidemiologia da toxoplasmose e avaliação ocular pela tela de Amsler, em pacientes da zona rural, atendidos na unidade de saúde do município de Jaguapitã, PR, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32(6): 671-676, 1999.

GLASNER, P. D. *et al*. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *American Journal of Ophthalmology*, 114: 136-144, 1992.

GRIGG, M. E. *et al*. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 184: 633-639, 2001.

GROSSMAN, P. L. & REMINGTON, J. S. The effect of trimethoprim and sulfamethoxazole on *Toxoplasma gondii* in vitro and in vivo. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 28: 445-455, 1979.

GROSSMAN, P. L.; KRAHENBUHL, J. L. & REMINGTON, J. S. In vivo and in vitro effects of trimethoprim and sulfamethoxazole on toxoplasma infection. *In*: SIEGENHALER, W. & LUTHY, R. (Eds.). *Current Chemotherapy: Proceedings of the 10th International Congress of Chemotherapy*. Washington: American Society of Microbiology, 1978.

HOLLAND, G. N. Ocular toxoplasmosis: new directions for clinical investigation. *Ocular Immunology and Inflammation*, 8: 1-7, 2000.

HOLLAND, G. N. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease. *American Journal of Ophthalmology*, 136: 973-988, 2003.

HOLLAND, G. N. & LEWIS, K. G. An update on current practices in the management of ocular toxoplasmosis. *American Journal of Ophthalmology*, 134: 102-114, 2002.

HOLLAND, G. N. *et al*. Toxoplasmosis. *In*: PEPOSE, J. S.; HOLLAND, G. N. & WILHELMUS, K. R. (Eds.). *Ocular Infection & Immunity*. St. Louis: Mosby, 1996.

HOLLAND, G. N. *et al*. Intraocular inflammatory reactions without focal necrotizing retinochoroiditis in patients with acquired systemic toxoplasmosis. *American Journal of Ophthalmology*, 128: 413-420, 1999.

HOWE, D. K. & SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasitegenotype with human disease. *The Journal of Infectious Diseases*, 172: 1.561-1.566, 1995.

HOWE, D. K. *et al*. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 1.411-1.414, 1997.

LASAVE, A. F. *et al*. Intravitreal clindamycin and dexamethasone for zone 1 toxoplasmic retinochoroiditis at twenty-four months. *Ophthalmology*, 117(9): 1.831-1.838, 2010.

MATOS, K. *et al*. Correlation between clinical diagnosis and PCR analysis of serum, aqueous, and vitreous samples in patients with inflammatory eye disease. *Arquivos Brasileiros de Oftamologia*, 70(1): 109-114, 2007.

MUCCIOLI, C. & BELFORT JR., R. *Manifestações Oculares da Aids: atlas e texto*. v. 1. São Paulo: Cultura Médica, 1999.

MUCCIOLI, C.; BELFORT JR., R. & ABREU, M. T. *Uveítes. Conselho Brasileiro de Oftalmologia*. São Paulo: Roca, 2001.

MUCCIOLI, C. *et al*. Ocular toxoplasmosis in HIV+ patients. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 35: 3.894-3.894, 1994.

MULLER, M. E. W. *Incidência de toxoplasmose em bulbos oculares do banco de olhos de São Paulo*, 1987. Dissertação de Mestrado, São Paulo: Escola Paulista de Medicina.

NGUYEN, B. T. & STADTSBAEDER, S. In vitro activity of cotrimoxazole on the intracellular multiplication of *Toxoplasma gondii*. *Pathologia Europaea*, 10: 307-315, 1975.

NUSSENBLATT, R. B.; WHITCUP, S. M. & PALESTINE, A. G. *Uveitis: fundamentals and clinical practice*. San Louis: Mosby, 1996.

OPREMCAK, E. M.; SCALES, D. K. & SHARPE, M. R. Trimethoprim-sulfamethoxazole therapy for ocular toxoplasmosis. *Ophthalmology*, 99: 920-925, 1992.

PETRILLI, A. M. N. *Uveítes na infância*, 1987. Dissertação de mestrado, São Paulo: Escola Paulista de Medicina.

REMINGTON, J. S. *et al*. Toxoplasmosis. *In*: REMINGTON, J. S. *et al*. (Eds.). *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. 6. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006.

ROTHOVA, A. *et al*. Usefulness of aqueous humor analysis for the diagnosis of posterior uveitis. *Ophthalmology*, 115(2): 306-311, 2008.

SIBLEY, L. D. & BOOTHROYD, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature*, 359: 82-85, 1992.

SILVEIRA, C. *et al*. Acquired toxoplasmic infection as the cause of toxoplasmic retinochoroiditis in families. *American Journal of Ophthalmology*, 106: 362-364, 1988.

SILVEIRA, C. *et al*. A follow-up study of *Toxoplasma gondii* infection in southern Brazil. *American Journal of Ophthalmology*, 131(3): 351-354, 2001.

SILVEIRA, C. *et al*. The effect of long-term intermittent trimethoprim/sulfamethoxazole treatment on recurrences of toxoplasmic retinochoroiditis. *American Journal of Ophthalmology*, 134: 41-46, 2002.

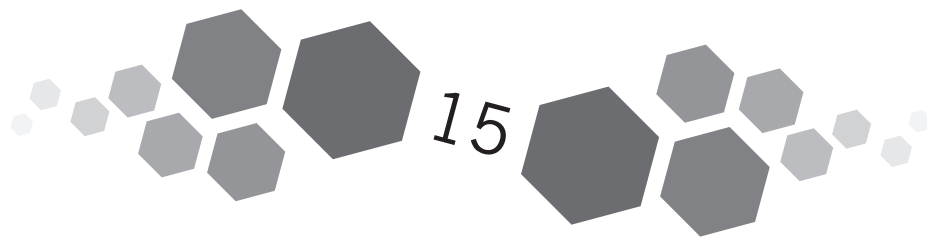
SILVEIRA, C. *et al*. Toxoplasmosis transmitted to a newborn from the mother infected 20 years earlier. *American Journal of Ophthalmology*, 136(2): 370, 2003.

SILVEIRA, C. *et al*. *Toxoplasma gondii* in the peripheral blood of patients with acute and chronic toxoplasmosis. *The British Journal of Ophthalmology*, 2011. doi: 10.1136/bjophthalmol-2011-301068

SOHEILIAN, M. *et al*. Patterns of uveitis in a tertiary eye care center in Iran. *Ocular Immunology and Inflammation*, 12(4): 297-310, 2004.

SOHEILIAN, M. *et al*. Randomized trial of intravitreal clindamycin and dexamethasone *versus* pyrimethamine, sulfadiazine, and prednisolone in treatment of ocular toxoplasmosis. *Ophthalmology*, 118(1): 134-141, 2010.

VALLOCHI, A. L. *et al*. Molecular markers of susceptibility to ocular toxoplasmosis, host and guest behaving badly. *Clinical Ophthalmology*, 2(4): 837-848, 2008.

VAUDAUX, J. D. *et al*. Identification of an atypical strain of *Toxoplasma gondii* as the cause of a waterborne outbreak of toxoplasmosis in Santa Isabel do Ivai, Brazil. *The Journal of Infectious Diseases,* 202(8): 1.226-1.233, 2010.

Anatomia Patológica na Toxoplasmose:
aspectos sistêmicos, neurológicos e oculares

Miguel N. Burnier Jr. • Bruno F. Fernandes

A apresentação da doença causada por *Toxoplasma gondii* é relativamente rara em humanos, considerando-se que a toxoplasmose é a forma de infecção parasitária mais comum em mamíferos e aves. Isso se deve em parte ao fato de que a infecção em humanos normalmente ocorre de forma assintomática. Estudos indicam que até 50% da população já teve contato com o parasita, tendo desenvolvido a doença ou não. A epidemiologia da infecção reflete a necessidade do hospedeiro definitivo (gato) e condições climáticas propícias (alta temperatura e umidade).

O foco deste capítulo serão as alterações morfológicas nos tecidos afetados, decorrentes da ação direta do parasita ou da consequente reação inflamatória. Importante notar que as alterações no tecido infectado são dependentes do estado imunológico do hospedeiro. Logo, pacientes imunossuprimidos apresentarão – ou não – achados histopatológicos específicos. Praticamente qualquer tecido pode apresentar a infecção, embora as manifestações mais comuns se observem nos linfonodos, no sistema nervoso central (SNC), nos olhos, no fígado, nos pulmões e no miocárdio.

DOENÇA SISTÊMICA ADQUIRIDA

A primeira interação do parasita com o hospedeiro ocorre no trato intestinal, logo após a ingestão de esporozoítas ou bradizoítas. O invólucro parasitário é digerido por enzimas digestivas, então o parasita é liberado e invade o epitélio intestinal. No meio intracelular, os taquizoítas proliferam rapidamente, atravessam a membrana basal intestinal e iniciam a disseminação pela circulação linfática intestinal. Eventualmente, formas livres e intracelulares atingem a corrente sanguínea com acesso a virtualmente qualquer órgão do corpo humano. No entanto, as alterações mais importantes ocorrem em áreas com privilégio imunológico, como o SNC, no caso do paciente imunodeprimido; o olho, no paciente imunocompetente; e o tecido fetal, na gestante (Barragan & Sibley, 2003).

Como já foi dito, a infecção por *T. gondii* normalmente ocorre de forma assintomática em pacientes imunocompetentes. Quando manifesta, a infecção toxoplásmica acomete principalmente o sistema reticuloendotelial: linfonodos, fígado e baço (Ho-Yen, 2001).

Linfonodos

A toxoplasmose é uma causa importante de linfadenite, e corresponde a 2%-4% dos casos com confirmação histopatológica (Miettinen *et al*., 1980). A cadeia cervical posterior é mais frequentemente afetada, apesar de qualquer linfonodo poder estar envolvido. Curiosamente, o parasita é encontrado em um linfonodo em menos de 1% dos casos de toxoplasmose quando este é submetido à biópsia (Frenkel, 1976). Por sua vez, a mera presença de cistos de toxoplasma no linfonodo de uma pessoa cronicamente infectada não é suficiente para o diagnóstico de linfadenite toxoplásmica (Sun, 1982). O achado típico, originalmente descrito por Piringer-Kuchinka, Martin e Thalhammer (1958), é a presença de agregados de células epitelioides na zona perifolicular. Tais agregados invadem as margens dos folículos linfoides hiperplásicos, tornando-as menos distintas, e estendem-se até os centros germinativos. A atividade mitótica é marcante, assim como a presença de fagocitose de debris celulares. A maioria desses microgranulomas tem um padrão monótono, com alguns linfócitos ocasionais entre as células epitelioides. Normalmente não se encontra necrose, supuração ou células gigantes. Outro achado característico é a distensão dos seios subcapsulares e trabeculares causada por células monocitoides (Dorfman & Remington, 1973). A aspiração por agulha fina é uma opção diagnóstica, que fornece sensibilidade de 72,7%-81,8% e especificidade de 98,8%-100% (Viguer *et al*., 2005).

Embora os critérios expostos tenham alta especificidade (96,6%), a sensibilidade é limitada (44,4%). Recentemente, foi proposto um algoritmo para o diagnóstico histopatológico da linfadenite toxoplásmica (Eapen *et al*., 2005). Os seguintes achados compõem tal algoritmo: presença de microgranulomas (menos de 25 células epitelioides) (Figura 1), distensão paracortical, hiperplasia paracortical (Figura 2), infiltração sinusoidal por células monocitoides (Figura 3), presença de macrogranuloma (mais de 25 células epitelioides, sem necrose) e ausência de células gigantes. Tais parâmetros garantem uma alta especificidade (96,6%), com maior sensibilidade (100%) do que os definidos por Piringer-Kuchinka, Martin e Thalhammer (1958).

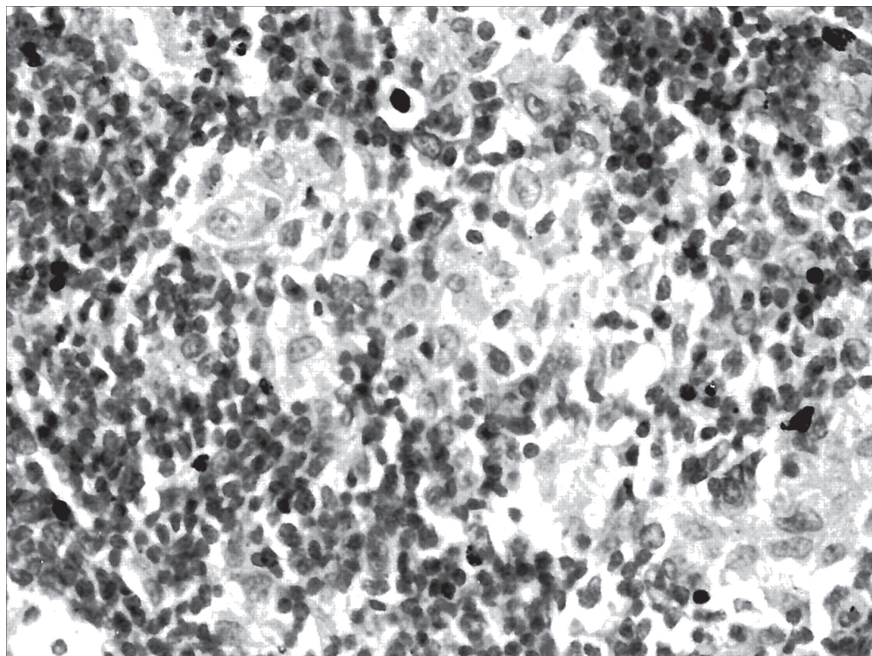
Figura 1 – Linfadenite toxoplásmica

Microgranulomas com menos de 25 células epitelioides. (H&E, x400). (*Copyright* Elsevier, 2005.)

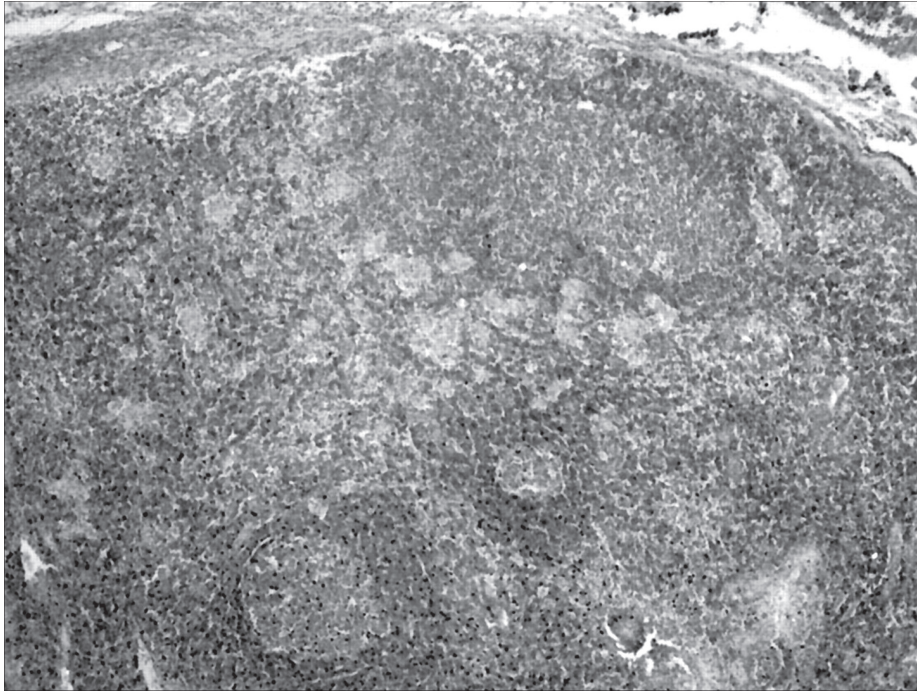
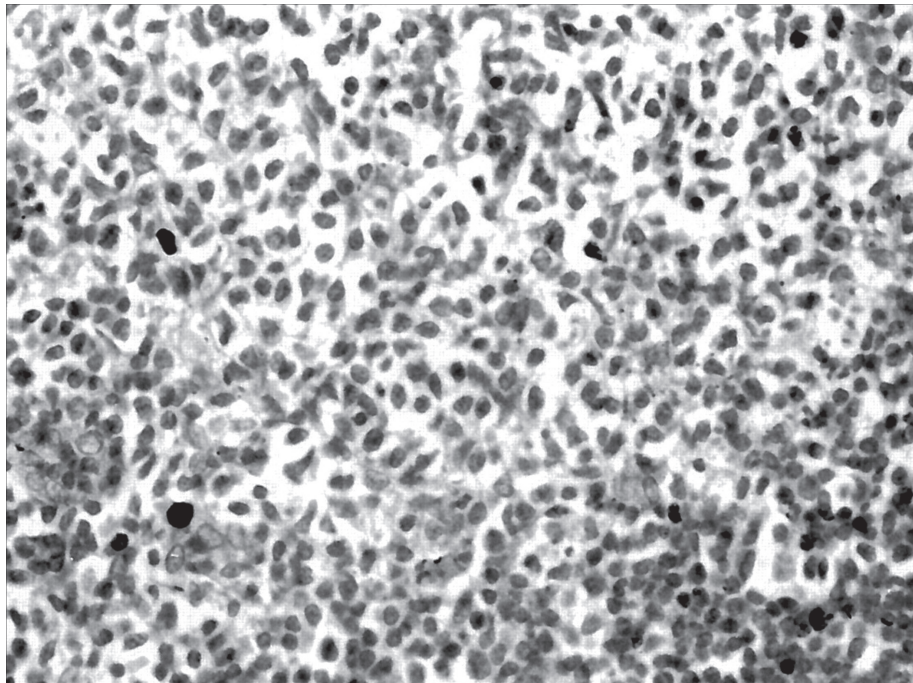
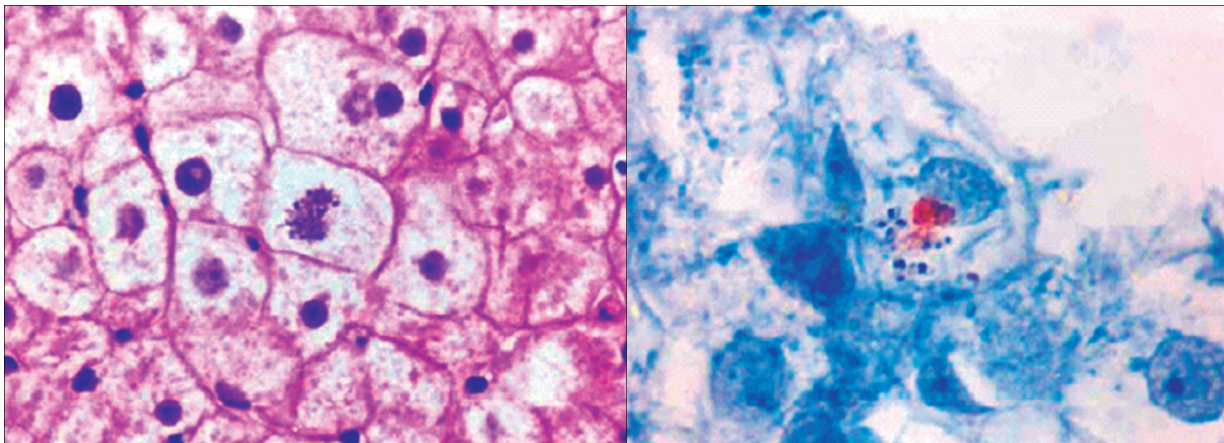
Figura 2 – Linfadenite toxoplásmica

Hiperplasia folicular e microgranulomas localizados na região paracortical. (H&E, x100). (*Copyright* Elsevier, 2005.)

Figura 3 – Linfadenite toxoplásmica

Presença de células monocitoides. (H&E; x400). (*Copyright* Elsevier, 2005.)

As alterações agudas observadas em órgãos específicos são basicamente decorrentes da necrose de células individuais infectadas pelo parasita. Os taquizoítas se multiplicam no interior da célula, levando à morte e liberação do parasita no parênquima tecidual. Novas células são infectadas, aumentando gradativamente a área de necrose e o infiltrado inflamatório (Frenkel, 1971).

Fígado

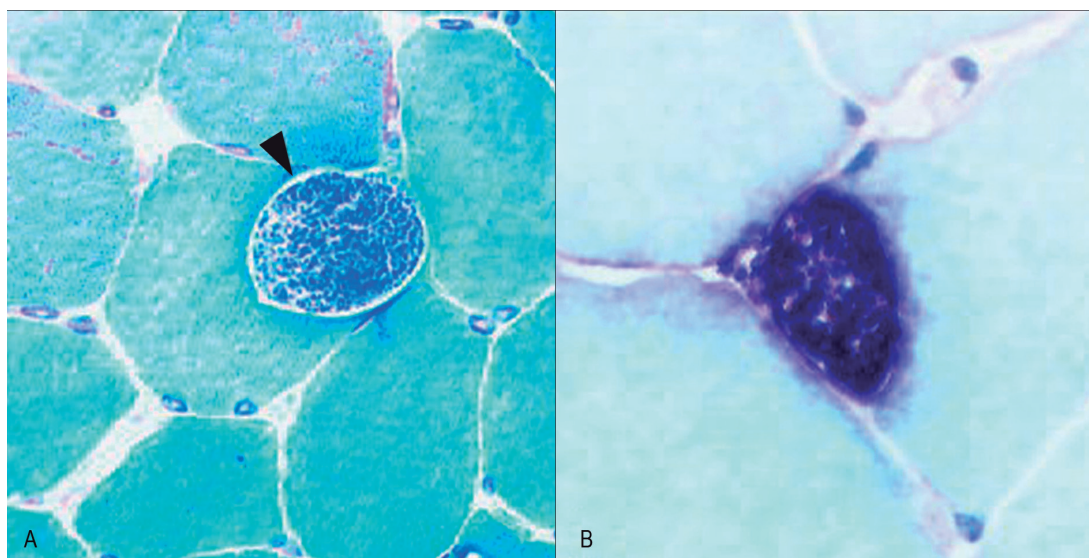
O envolvimento hepático ocorre no início do processo infeccioso e é mais comumente associado à infecção congênita. No entanto, a extensão da doença raramente afeta o resultado de testes de função hepática ou causa sinais ou sintomas de hepatite. Aparentemente, a hepatite é mais comum quando a infecção se deve a uma cepa mais virulenta da toxoplasmose. O quadro de hepatite toxoplásmica é caracterizado por extensas áreas de necrose, presença de células gigantes e hematopoiese extramedular. Linfócitos e plasmócitos também compõem o infiltrado inflamatório. As células de Kupffer mostram hipertrofia e hiperplasia. O parasita pode ser visto no citoplasma das células de Kupffer ou dos hepatócitos (Figura 4) (Dogan *et al.*, 2007). O comprometimento esplênico também ocorre precocemente no curso da doença; porém, a esplenomegalia é rara.

Figura 4 – Hepatite toxoplásmica

Taquizoítas vistos no citoplasma de um hepatócito (à esquerda). Confirmação imuno-histoquímica com marcadores específicos para toxoplasmose (à direita).

Fonte: Dogan *et al.*, 2007.

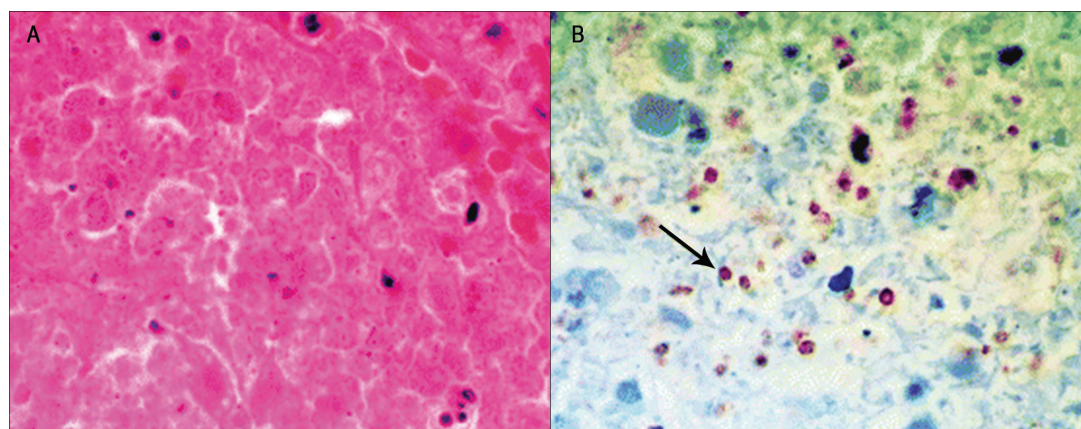
Músculo

O achado típico do acometimento muscular por *T. gondii* é a necrose de fibras individuais infectadas pelo parasita com proliferação dos sarcolemas e infiltração por macrófagos, linfócitos T e ocasionalmente neutrófilos. Pseudocistos podem ser vistos sem despertar nenhuma reação inflamatória. Microrganismos extracelulares não são encontrados. Polimiosite secundária à toxoplasmose é rara, porém possível (Figura 5). A inflamação pode também envolver áreas remotas do músculo afetado (Plonquet *et al.*, 2003).

Figura 5 – Miosite toxoplásmica

A – Aspecto transverso de uma biópsia muscular mostrando um cisto de toxoplasma (cabeça de seta) (tricrômico de Gomori modificado; x800). B – Imuno-histoquímica em que se observa um cisto de toxoplasma sem nenhuma reação inflamatória. As fibras musculares adjacentes estão normais (x1.200). (*Copyright* John Wiley and Sons, 2003.)

Pulmão

O pulmão é um dos sítios onde a infecção é possível, embora o envolvimento pulmonar isolado seja extremamente raro. Na pneumonite toxoplásmica, encontra-se uma inflamação intersticial e intra-alveolar com proliferação dos pneumócitos, muitas vezes infectados. O espaço alveolar é preenchido por macrófagos que contêm pseudocistos, células mononucleares e um exsudato fibrinoso. Os septos alveolares se tornam hiperemiados pela inflamação. Taquizoítas podem ser vistos também no centro de focos de necrose (Eza & Lucas, 2006) (Figura 6). Como método diagnóstico, emprega-se o lavado broncoalveolar e a visualização direta dos taquizoítas em esfregaços corados pela técnica Giemsa (Kovari *et al*., 2010) (Figura 6).

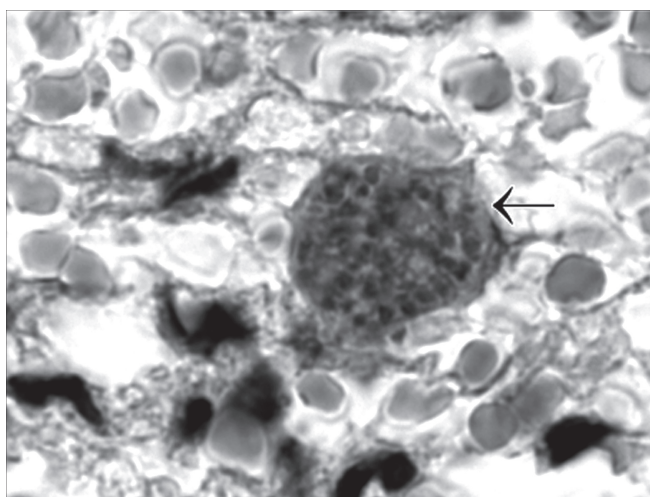
Figura 6 – Toxoplasmose pulmonar

A – Microscopia de uma área de necrose secundária à toxoplasmose. O parasita é dificilmente identificado (H&E, x200). B – Imuno-histoquímica evidencia os taquizoítas na mesma área mostrada acima (seta) (x200). (*Copyright* John Wiley and Sons, 2006.)

Além dos órgãos descritos, a toxoplasmose pode causar um infiltrado inflamatório semelhante no coração, no pâncreas, nas glândulas adrenais e nas parótidas, entre outros órgãos. No rim, uma glomerulonefrite por imunocomplexos foi descrita em casos de toxoplasmose. Quando os testículos são afetados, encontra-se necrose extensa associada a um infiltrado inflamatório composto por células polimorfonucelares e eosinófilos. O parasita é visto dentro dos túbulos seminíferos.

Após a fase aguda da doença e a resolução do processo inflamatório, o parasita pode permanecer no tecido infectado indefinidamente. Em relação à fase crônica, as alterações morfológicas são basicamente resultantes da ruptura de cistos, infecção e necrose de células do parênquima adjacente e consequente reação inflamatória. Tais reativações podem acometer qualquer órgão.

ENVOLVIMENTO NEUROLÓGICO

A encefalite toxoplásmica é, certamente, a complicação mais grave da doença, podendo ser dividida nas formas congênita e adulta (Best & Finlayson, 1979). A forma congênita é caracterizada pela necrose periventricular secundária ao acometimento vascular, na forma de perivasculite, vasculite ou trombose (Frenkel, 1976). Durante a macroscopia, notam-se vários focos necróticos hemorrágicos e não hemorrágicos de até 4 cm de diâmetro. Tais lesões podem atravessar um sulco e envolver o córtex adjacente. Nos casos de doença avançada, com aumento da pressão intracraniana, podem-se encontrar alterações típicas de herniação. Na microscopia, os focos necróticos mostram infiltração por monócitos, linfócitos e plasmócitos. Os taquizoítas normalmente estão localizados na periferia de tais focos, vistos como pontos azuis, medindo de 1 μm a 2 μm. Recomendam-se cortes histológicos mais finos (2 μm) para melhor visualização do parasita. Quando as células infectadas estão completamente preenchidas por taquizoítas, estas assumem um contorno irregular, e são denominadas então pseudocistos (Figura 7). Cistos verdadeiros são arredondados, medindo em média 30 μm, têm uma parede de 1 μm de espessura e contêm inúmeros parasitas em seu interior. Tanto os taquizoítas quanto os bradizoítas contêm grânulos e coram com a coloração de PAS. Em um estágio mais tardio, os focos necróticos calcificam-se, explicando o achado radiológico característico de calcificação periventricular. Quando o aqueduto também é afetado, ocorre hidrocefalia.

Figura 7 – Toxoplasmose cerebral

Pseudocisto do protozoário composto por inúmeros bradizoítas em um caso de toxoplasmose cerebral (seta). (H&E, x1.000). (*Copyright* John Wiley and Sons, 2007.)

A forma adulta é frequentemente vista como uma infecção oportunista. Além das alterações morfológicas observadas na forma congênita, encontram-se inúmeros focos de necrose com a presença de cistos e trofozoítas livres (Best & Finlayson, 1979). Nas fases precoces da doença, a inflamação resultante é mínima ou muitas vezes ausente.

COMPROMETIMENTO OCULAR

O toxoplasma é responsável pela maioria dos casos de coriorretinite em adultos e crianças. O quadro histopatológico típico é caracterizado pela presença de extensa necrose da retina com a presença de taquizoítas livre e cistos. Todas as camadas da retina são envolvidas pelo processo infeccioso. Importante notar que o parasita não é encontrado além da retina em indivíduos imunocompetentes. Outras estruturas oculares sofrem devido ao processo inflamatório secundário, mas o protozoário não é encontrado, seja na forma ativa, seja na cística. Áreas da retina adjacentes às lesões ativas apresentam inflamação perivascular, edema, gliose e eventuais focos hemorrágicos. Logo abaixo da retina neurossensorial, observa-se o epitélio pigmentar da retina, que também é afetado pela infecção. Entre esta camada de células pigmentadas e a camada de Bruch, notam-se depósitos eosinofílicos importantes para o diagnóstico de retinite a esclarecer (Belfort *et al*., 2010). Tais depósitos correspondem a debris resultantes de morte celular e degradação da membrana de Bruch (Figuras 8). Outras causas de retinite, como citomegalovírus ou herpes simples, podem ter apresentação semelhante em alguns casos, porém tais depósitos subepiteliais são vistos exclusivamente em casos de toxoplasmose. Tal achado é de extrema importância especialmente nos casos em que o número de cistos e parasitas livres é limitado. A coroide apresenta reação inflamatória granulomatosa secundária, composta por linfócitos e macrófagos em números variados (Figura 9). Após a fase aguda, a sequela resultante é uma cicatriz coriorretiniana com centro branco e bordos pigmentados.

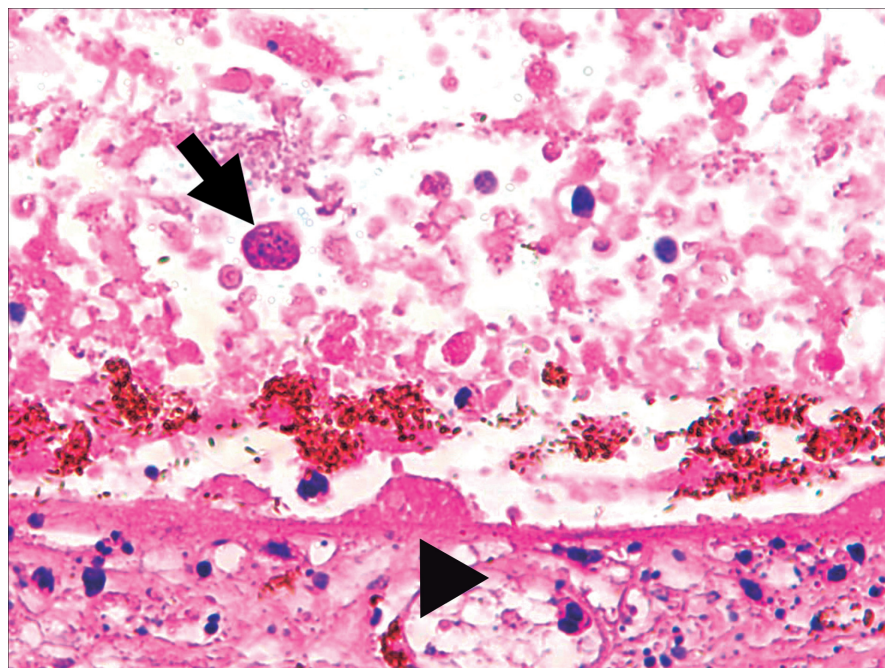
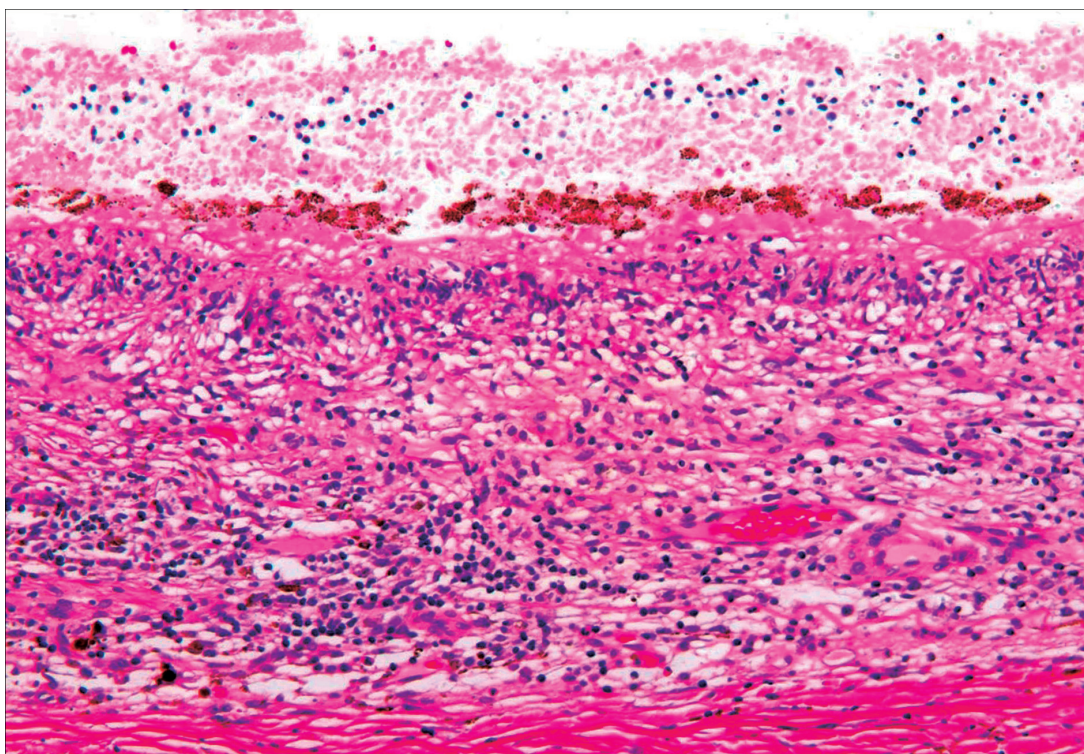
Figura 8 – Coriorretinite toxoplásmica

Além da total necrose da retina, nota-se um cisto de toxoplasma (seta). Logo acima da membrana de Bruch, formam-se depósitos eosinofílicos subepiteliais secundários à necrose celular, típicos de toxoplasmose ocular (cabeça de seta) (H&E, x200).

Figura 9 – Coriorretinite toxoplásmica

No paciente imunocompetente, a necrose retiniana é acompanhada de uma reação inflamatória secundária na coroide, composta por linfócitos e células epitelioides (H&E, x200).

Muito embora o parasita se encontre restrito à retina em imunocompetentes, a inflamação secundária pode comprometer todo o trato uveal: coroide, corpo ciliar e íris. O infiltrado inflamatório também acomete a cavidade vítrea, quando a turvação resultante muitas vezes impede a visualização das lesões retinianas. As células dispersas eventualmente atingem o segmento anterior do olho, flutuando no humor aquoso e depositando-se na superfície posterior da córnea. O achado clínico resultante de precipitados grandes, com aspecto de 'gordura de carneiro' (*mutton fat*), nada mais é do que granulomas compostos por células histiocíticas. Conforme a severidade da inflamação, tais agregados podem obstruir a malha trabecular, bloquear o escoamento do humor aquoso e causar elevação da pressão intraocular.

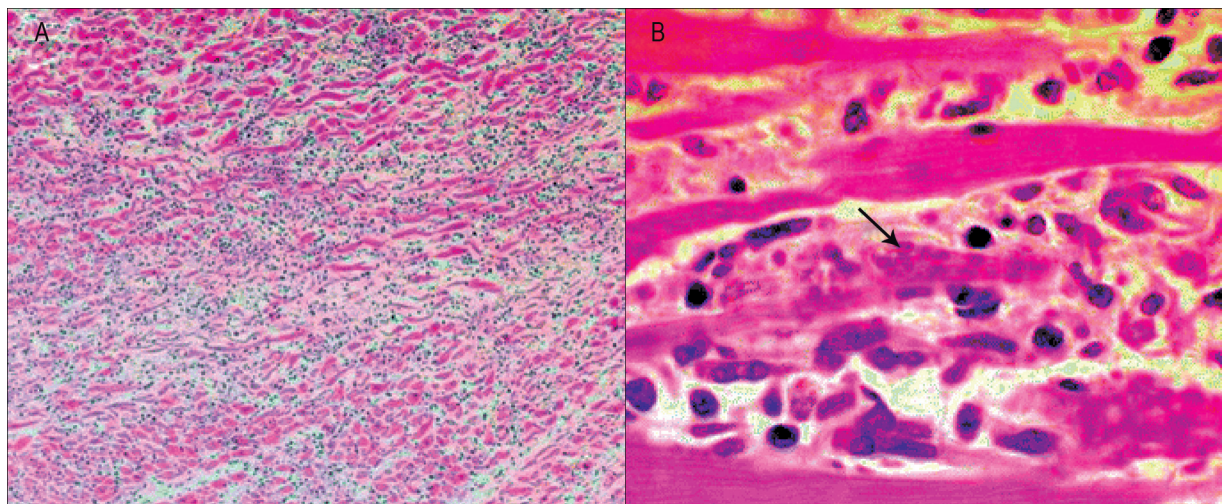
O nervo óptico pode ser afetado pela toxoplasmose de três formas: infecção direta, papilite secundária ou papiledema associado ao aumento de pressão intracraniana. Nesses casos, ocorre atrofia óptica após a resolução do quadro agudo (Perkins, 1973; Mets *et al.*, 1997).

CONSIDERAÇÕES ESPECIAIS SOBRE O PACIENTE IMUNODEPRIMIDO

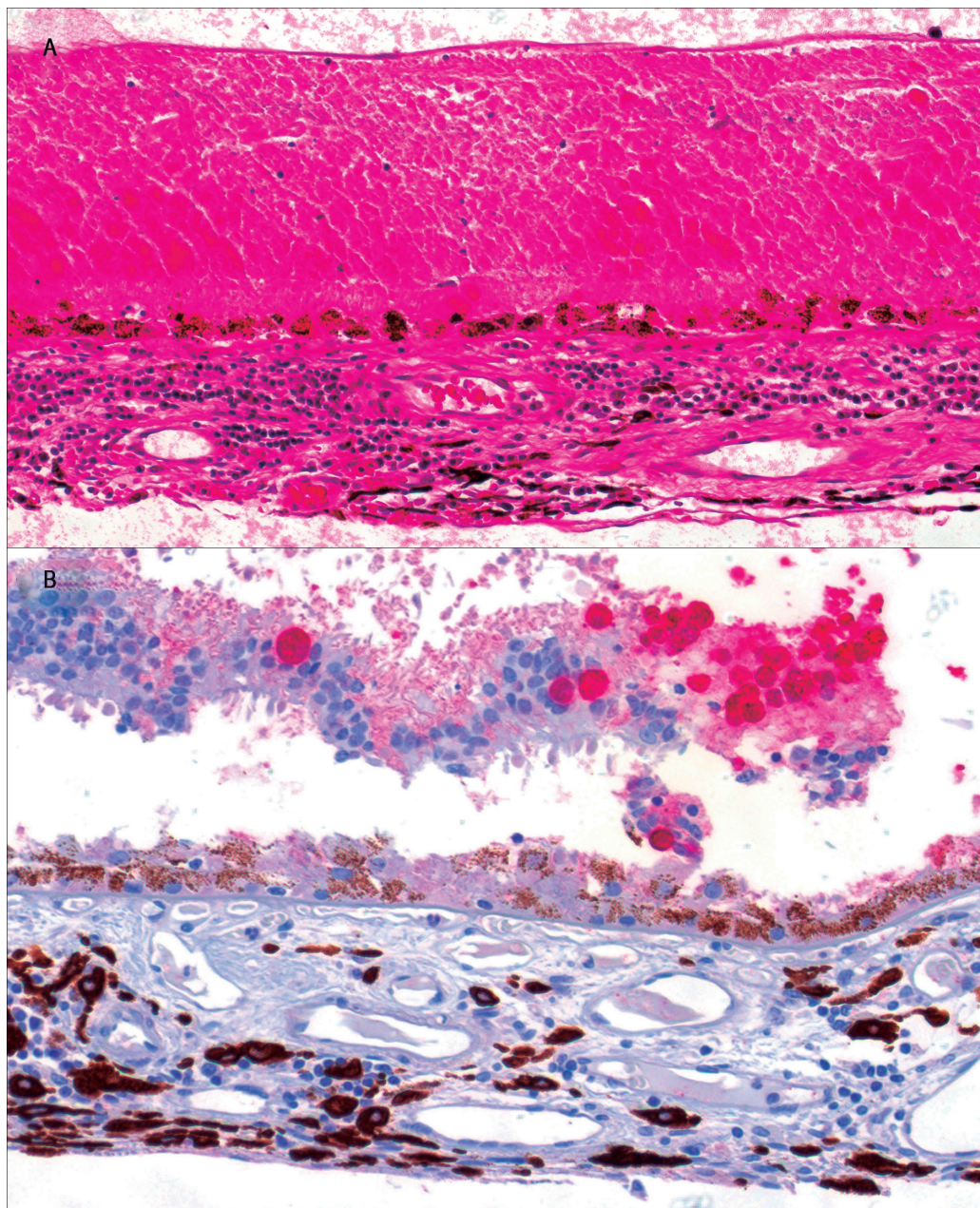
Ao passo que em indivíduos imunocompetentes a toxoplasmose apresenta – quando muito – somente sinais e sintomas gripais (Gutierrez, 1990), no imunodeprimido a infecção é geralmente fatal, se não for diagnosticada e tratada adequadamente. A toxoplasmose como infecção oportunista ocorre em virtude da reativação de cistos presentes em qualquer tecido do corpo humano (Garcia *et al.*, 1991). No entanto, as lesões no SNC e no coração são as principais, por acarretarem significante morbidade e mortalidade. Até 10% dos pacientes com Aids desenvolvem a toxoplasmose cerebral (McCabe & Remington, 1988).

As áreas do SNC mais comumente afetadas pela toxoplasmose são a junção corticomedular, os núcleos da base e o tálamo, apesar de o tronco cerebral também poder ser afetado. O achado histopatológico típico é uma inflamação aguda perivascular necrosante multifocal. Necrose subaguda multifocal acompanhada de infiltração linfocitária mista também é encontrada. Os focos necróticos no tecido cerebral podem evoluir ao ponto de formarem cavidades císticas. Taquizoítas e cistos são vistos principalmente nas áreas de inflamação, não só do parênquima cerebral, mas também nas meninges. A técnica imuno-histoquímica específica para toxoplasmose auxilia na identificação do parasita. A calcificação é mais comum na forma congênita, apesar de ser vista em alguns casos no adulto após uma terapia bem-sucedida (Lee *et al.*, 2009).

A miocardite toxoplásmica é secundária à infecção direta dos miócitos pelo parasita. Na macroscopia, o coração adquire um aspecto globoso e flácido. Quando encontrado nas fibras musculares, o cisto assume uma forma alongada. A ruptura dos cistos naturalmente gera uma reação inflamatória caraterizada por uma infiltração de células mononucleares (Gerberding, 1992) (Figura 10).

Figura 10 – Miocardite toxoplásmica

A – Foto mostra uma miocardite extensa (H&E, x40). B – Outra microfotografia, agora em maior aumento, exibe os taquizoítas entre as fibras musculares cardíacas (seta) (H&E, x400). (*Copyright* John Wiley and Sons, 2006.)

A coriorretinite toxoplásmica no imunodeprimido comumente tem uma apresentação clínica atípica, dificultando o diagnóstico clínico. Cicatrizes antigas, que quando presentes facilitam o diagnóstico, normalmente estão ausentes. Outras retinites, também oportunistas, podem cursar de forma semelhante (Belfort *et al.*, 2010). A reação inflamatória é mais discreta ou até mesmo ausente, dependendo do estado imunológico do paciente. As lesões em si tendem a ser mais extensas. Nesses casos, a biópsia de retina pode confirmar o diagnóstico, pela visualização direta do parasita. Técnicas imuno-histoquímicas são úteis para melhor visualização do agente infeccioso. Os achados morfológicos são similares ao imunocompetente, mas a reação inflamatória na coroide é bem mais discreta e o número de parasitas encontrados é maior (Figura 11). Interessante notar também que no imunodeprimido o parasita pode ser encontrado na coroide, enquanto no imunocompetente ele está confinado na retina (Rehder *et al.*, 1988). Quando se quer evitar a biópsia, a opção é o uso da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do DNA do parasita em amostras de vítreo (punção aspirativa) (Brezin *et al.*, 1991).

Figura 11 – Coriorretinite toxoplásmica no imunodeprimido

A – Mínima reação inflamatória na coroide apesar de extensa necrose de todas as camadas da retina (H&E, x200). B – Imuno-histoquímica específica para toxoplasmose torna evidentes inúmeros cistos entre as camadas da retina (x200).

Outra manifestação rara da toxoplasmose no doente imunodeprimido é o aparecimento de múltiplos nódulos subcutâneos. As pápulas de aspecto pleomórfico podem acometer o torso, as extremidades, o abdome e a face. As lesões são discretas, bem circunscritas, sem induração ou necrose. Outra apresentação descrita é a de uma lesão única, com sinais inflamatórios semelhantes a um abscesso. A análise histopatológica evidencia o parasita

na epiderme, no tecido subcutâneo e até nos capilares superficiais. Múltiplos granulomas com necrose central e infiltrado inflamatório periférico compõem o quadro (Chen *et al.*, 2009).

INFECÇÃO CONGÊNITA

A parasitemia temporária durante o primeiro contato com *T. gondii* pode ocasionar contaminação fetal. Quando a placenta é infectada, os taquizoítas são dispersos na placa coriônica, na decídua e no âmnio. A placenta se torna avascular com áreas de fibrose e inflamação necrosante das vilosidades coriônicas. Inúmeras células gigantes multinucleadas são vistas, assim como agregados nodulares de histiócitos logo abaixo da camada sincicial. Observam-se tanto cistos quanto formas livres do parasita. O lado fetal da placenta é mais severamente afetado do que o lado maternal.

Além da placenta, o parasita pode ser encontrado no cordão umbilical, assim como em qualquer outro órgão estudado microscopicamente. Punção aspirativa do líquido amniótico pode ser indicada nos casos suspeitos. Nos preparados citológicos, o taquizoíta é visto com uma estrutura curva, medindo de 3 μm a 4 μm de comprimento e 1 μm a 2 μm de largura, com um núcleo central. Os parasitas são vistos não só dentro do citoplasma de células infectadas, mas também isolados, sendo este último achado um artefato do esfregaço. Cistos também são encontrados (Gutierrez & Lichtenberg, 1996).

Tanto na macroscopia quanto na microscopia, as alterações mais marcantes secundárias à infecção congênita são as que afetam o SNC. Focos de necrose, inflamação crônica e áreas calcificadas na zona cortical são achados histopatológicos típicos. Quando há hidrocefalia, nota-se uma dilatação dos ventrículos, destruição do tecido cerebral e afinamento da camada óssea craniana. O epêndima é afetado pela infiltração de monócitos, plasmócitos e eosinófilos. A reação meníngea é menos marcante do que a periventricular. A análise do líquido cefalorraquidiano mostra aspecto amarelado, aumento de proteína e de celularidade (linfócitos e monócitos). Organismos também podem ser encontrados.

A coriorretinite na toxoplasmose congênita ocorre durante a fase fetal. Os achados histopatológicos da fase aguda são semelhantes aos da forma adulta: áreas de necrose retiniana, edema e reação inflamatória. Cistos normalmente não são encontrados (Brezin *et al.*, 1991). O nervo óptico pode estar afetado, mas na maioria dos casos isso ocorre apenas como manifestação secundária da toxoplasmose encefálica. Ao nascimento, o exame fundoscópico evidencia cicatrizes inativas da infecção, sugerindo que a resolução do processo infeccioso/inflamatório também ocorre dentro do útero. Infecções congênitas mais severas podem comprometer o desenvolvimento do globo ocular, resultando em microftalmia e microcórnea (Mets *et al.*, 1997). Nesses casos, as dimensões oculares diminuem e a acuidade visual é bastante comprometida.

Importante lembrar que alguns recém-nascidos podem apresentar sintomas discretos e, posteriormente, desenvolver recorrências na forma de meningoencefalite ou coriorretinite.

REFERÊNCIAS

BARRAGAN, A. & SIBLEY, L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends in Microbiology*, 11(9): 426-430, 2003.

BELFORT, R. N. *et al*. Bilateral progressive necrotizing retinochoroiditis in an immunocompromised patient: histopathological diagnosis. *Acta Ophthalmologica*, 88(5): 614-615, 2010.

BEST, T. & FINLAYSON, M. Two forms of encephalitis in opportunistic toxoplasmosis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 103(13): 693-696, 1979.

BREZIN, A. P. *et al*. Analysis of aqueous humor in ocular toxoplasmosis. *The New England Journal of Medicine*, 324(10): 699, 1991.

CHEN, X. *et al*. Fine-needle aspiration cytology of subcutaneous toxoplasmosis: a case report. *Diagnostic Cytopathology*, 38(10): 716-720, 2009.

DOGAN, N. *et al*. Toxoplasmic hepatitis in an immunocompetent patient. *Türkiye Parazitolojii Dergisi*, 31(4): 260-263, 2007.

DORFMAN, R. F. & REMINGTON, J. S. Value of lymph-node biopsy in the diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. *The New England Journal of Medicine*, 289(17): 878-881, 1973.

EAPEN, M. *et al*. Evidence based criteria for the histopathological diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy. *Journal of Clinical Pathology*, 58(11): 1.143-1.146, 2005.

EZA, D. E. & LUCAS, S. B. Fulminant toxoplasmosis causing fatal pneumonitis and myocarditis. *HIV Medicine*, 7(6): 415-420, 2006.

FRENKEL, J. K. Toxoplamosis. *In*: MARCIA-ROJAS, R. A. (Ed.). *Pathology of Protozoal and Helmintic Diseases*. Baltimore: Williams &Wilkins, 1971.

FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis. *In*: BINFORD, C. H. & CONNOR, D. H. *Pathology of Tropical and Extraordinary Diseases*. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1976.

GERBERDING, J. L. *et al*. Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 36-1992. Abrupt development of cardiac enlargement and respiratory distress in a 31-year-old man with Aids. *The New England Journal of Medicine*, 327(11): 790-799, 1992.

GARCIA, L. W. *et al*. Acquired immunodeficiency syndrome with disseminated toxoplasmosis presenting as an acute pulmonary and gastrointestinal illness. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 115(5): 459-463, 1991.

GUTIERREZ, Y. *Diagnostic Pathology of Parasitic Infections with Clinical Correlations*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990.

GUTIERREZ, Y. & VON LICHTENBERG, F. Protozoal diseases. *In*: DAMJANOV, I. & LINDER, J. *Anderson's Pathology*. St. Louis: Mosby-Year Book, 1996.

HO-YEN, D. O. Infection in the immunocompetent. *In*: WREGHITT, T. G. & JOYNSON, D. H. M. *Toxoplasmosis: a comprehensive clinical guide*. Cambridge: Cambridge University Press, 2001.

KOVARI, H. *et al*. Pulmonary toxoplasmosis, a rare but severe manifestation of a common opportunistic infection in late HIV presenters: report of two cases. *Infection*, 38(2): 141-144, 2010.

LEE, G. T. *et al*. Best cases from the AFIP: cerebral toxoplasmosis. *Radiographics*, 29(4): 1.200-1.205, 2009.

McCABE, R. & REMINGTON, J. S. Toxoplasmosis: the time has come. *The New England Journal of Medicine*, 318(5): 313-315, 1988.

METS, M. B. *et al*. Eye manifestations of congenital toxoplasmosis. *American Journal of Ophthalmology*, 123(1): 1-16, 1997.

MIETTINEN, M. *et al*. Lymph node toxoplasmosis. Follow-up of 237 histologically diagnosed and serologically verified cases. *Acta Medica Scandinavica*, 208(6): 431-436, 1980.

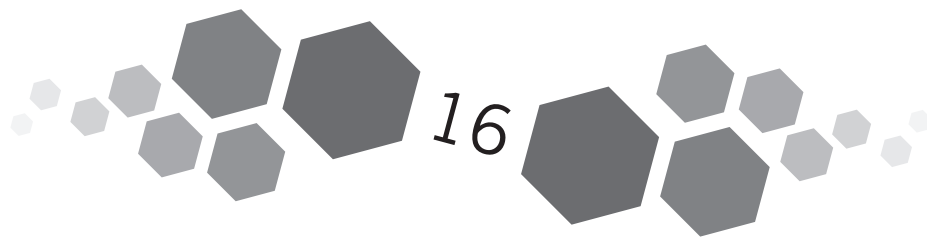
PERKINS, E. S. Ocular toxoplasmosis. *The British Journal of Ophthalmology*, 57(1): 1-17, 1973.

PIRINGER-KUCHINKA A., MARTIN, I. & THALHAMMER, O. Über die vorzuglich cerviconuchale Lymphadenitis mit kleinherdiger Epithelioid zellwucherung. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 331: 522-535, 1958.

PLONQUET, A. *et al*. Toxoplasmic myositis as a presenting manifestation of idiopathic CD4 lymphocytopenia. *Muscle Nerve*, 27(6): 761-765, 2003.

REHDER, J. R. *et al*. Acute unilateral toxoplasmic iridocyclitis in an Aids patient. *American Journal of Ophthalmology*, 106(6): 740-741, 1988.

SUN, T. Toxoplasmosis. *In*: SUN, T. *Pathology and Clinical Features of Parasitic Diseases*. New Yorky: Masson Publishing USA, 1982.

VIGUER, J. M. *et al*. Fine needle aspiration of toxoplasmic (Piringer-Kuchinka) lymphadenitis: a cytohistologic correlation study. *Acta Cytologica*, 49(2): 139-143, 2005.

Princípios Gerais de Terapêutica

João Silva de Mendonça

A toxoplasmose humana foi reconhecida entre o fim da década de 30 e o início da década de 40, primeiramente como doença de aquisição congênita e, depois, na forma adquirida pós-natal (revisto em Weiss, 2009). Nessa fase inicial, predominaram os relatos de formas mais graves, porém sem opções terapêuticas. Desde o fim dos anos 40 passaram a estar disponíveis reações sorológicas. A partir dos anos 50, com a realização de investigações soroepidemiológicas e com o reconhecimento da forma linfonodal da doença adquirida, a toxoplasmose caracterizou-se como expressão de uma protozoose humana amplamente disseminada. Também ganhou destaque a descoberta do comprometimento ocular, seja na forma congênita, seja na adquirida. Dada a possibilidade de comprometimentos graves na toxoplasmose congênita, também cresce o interesse em conhecer e prevenir a transmissão intrauterina do parasita. Mais recentemente, a caracterização do parasita *Toxoplasma gondii* como importante agente infeccioso oportunista, em pacientes com doença e/ou tratamento imunodepressor, adiciona especial destaque para a toxoplasmose humana. Ou seja, a evolução dos conhecimentos clínicos torna evidente a necessidade de opções farmacológicas tanto para terapêutica dos doentes, como para a potencial prevenção da transmissão materno-fetal.

Uma pioneira informação voltada para a utilização potencial de fármacos dotados de ação contra o parasita ocorre com um clássico estudo experimental (Eyles & Coleman, 1953), que documenta o efeito sinérgico entre a sulfadiazina e a pirimetamina. Na publicação original, afirma-se que "a ação destas drogas é tão significativa que proporciona fundamento para a expectativa de que a combinação possa ser efetiva no tratamento da doença humana" (1953: 483). Por sua vez, chama-se atenção para o fato de que "recomendações não podem ser feitas até que sejam disponíveis mais dados sobre a farmacologia da pirimetamina em humanos" (1953: 483). Este ponto é colocado em destaque, pois será merecedor de análise posterior.

As informações disponíveis com base em investigações em modelos animais e *in vitro* indicam uma considerável lista de medicamentos com ação reconhecida contra o parasita e, assim, com potencial para uso na doença humana. Entretanto, a extrapolação dos dados experimentais para a prática clínica não deve ser automática, tendo em conta, por exemplo, variáveis do parasita e dos modelos de experimentação (Derouin *et al.*, 1995).

Uma importante questão inicial diz respeito à comprovação da eficácia do tratamento da doença humana causada por *T. gondii*. A análise do benefício fica favoravelmente demonstrada quando se considera, por exemplo, o que sucede na doença oportunista reconhecida em pacientes imunocomprometidos (cancerosos, transplantados, doentes de Aids). Neste sentido, as maiores séries atuais dizem respeito aos pacientes com Aids que adoecem com comprometimento agudo do sistema nervoso central, praticamente sem sobrevida se não há tratamento específico. Observa-se, porém, expressivo sucesso quando o tratamento é adequada e oportunamente instituído (Heller, 2010a).

Aqui serão analisados somente medicamentos que dispõem de dados relativos ao uso em humanos, em particular os que têm aplicação mais extensiva (Frenkel & Bermudez, 2010; Heller, 2010b; Levi & Mendonça, 2003; McLeod & Remington, 2004; Montoya & Liesenfeld, 2004; Nee & Joiner, 2000), muito embora frequentemente não preencham os modernos critérios da medicina baseada em evidências (estudos comparativos com placebo ou padrão-ouro, randômicos e duplo-cegos). Tais medicamentos compõem os seguintes grupos:

- sulfamídicos: sulfadiazina; sulfametoxazol;
- diaminopiridinas: pirimetamina; trimetoprim;
- lincosaminas: clindamicina;
- macrolídios: espiramicina, azitromicina e claritromicina.

SULFADIAZINA

Um dos mais antigos sulfamídicos, a sulfadiazina, em uso combinado com a pirimetamina, proporciona ação sinérgica, quando então representam o padrão-ouro do tratamento da toxoplasmose. Em princípio, essa combinação de drogas serve de parâmetro para outras opções terapêuticas, em virtude da origem e da consistência dos conhecimentos obtidos com seu emprego no tratamento da toxoplasmose, ainda que não tenha sido submetida a um amplo estudo controlado com placebo.

A sulfadiazina age no metabolismo dos folatos (inibição da di-hidropteroato sintetase), antagonizando a formação do ácido di-hidrofólico. Administrada por via oral, tem meia-vida de aproximadamente dez a 12 horas, o que pode permitir a administração em duas tomadas diárias, muito embora a prática ainda seja ministrar quatro tomadas a cada seis horas. A comparação dos dois regimes de administração revela que o de duas tomadas produz concentrações plasmáticas similares às que são obtidas com o esquema de quatro tomadas (Jordan *et al.*, 2004).

Posologia para adultos: 4 g diários, ou 1 g a cada seis horas, ou 2 g a cada 12 horas; há citação de 500 mg-1.500 mg administrados de duas a quatro vezes ao dia. Em pediatria, a dosagem recomendada é de 100 mg/kg/dia. Há necessidade de ser mantido um bom débito urinário, como prevenção da formação de cristalúria, sendo que a alcalinização da urina reduz a possibilidade deste evento adverso. Os principais efeitos colaterais incluem reações alérgicas como febre e erupção cutânea; além disso, manifestações gastrintestinais, nefrotoxicidade, toxicidade da medula óssea, hepatite medicamentosa, anemia hemolítica.

PIRIMETAMINA

A pirimetamina tem atividade maior que os sulfamídicos e, assim, constitui medicamento preferencial no tratamento da toxoplasmose humana, sobretudo nos casos de maior gravidade. Também age no metabolismo dos folatos, sequencialmente à ação dos sulfamídicos, pela inibição da di-hidrofolato redutase, antagonizando assim a formação do ácido

tetra-hidrofólico (este, com o radical formil é conhecido como ácido folínico). Administrada por via oral, a pirimetamina tem rápida absorção e meia-vida de cerca de quatro dias (80-120 horas), alcançando o estado de equilíbrio após três dias de administração. Alcança concentrações no liquor correspondentes a 10%-20% das concentrações plasmáticas.

Posologia para adultos: 25-50-75 mg/dia em uma só tomada, com citação de uma dose de ataque inicial de 100-200 mg, especialmente nos doentes com maior gravidade. Em pediatria, 0-5-1,0 mg/kg/dia. A tradição de administração diária da pirimetamina contrasta com o conhecimento posterior de sua farmacologia, com destaque para sua longa meia-vida. Dado que sua frequente mielotoxicidade é dose dependente, e com o intuito de atenuar tal evento adverso, recomenda-se que, após os três primeiros dias de tratamento, a administração passe a ser feita a cada dois a quatro dias. Os principais efeitos colaterais incluem supressão da medula óssea, com plaquetopenia, leucopenia e anemia; pela frequência com que ocorrem, há indicação do uso concomitante de ácido folínico por via oral como prevenção (adultos: 10-25 mg/dia), e por via parenteral como terapia da mielotoxicidade. O ácido folínico é antagonista da ação inibitória da pirimetamina em células de mamíferos, mas não é metabolicamente aproveitado pelo protozoário. Reações alérgicas são menos frequentes em comparação com os sulfamídicos.

COTRIMOXAZOL

O cotrimoxazol é uma combinação fixa do sulfamídico sulfametoxazol com a diaminopiridina trimetoprim. Entra em consideração por causa da melhor tolerabilidade e facilidade de administração em comparação com a dupla sulfadiazina e pirimetamina. Da mesma forma, são medicamentos inibidores do metabolismo de folatos, nos mesmos dois passos sequenciais. Há rápida e quase completa absorção quando administrados por via oral, com boa distribuição tecidual, inclusive no sistema nervoso central. Ambos os medicamentos possibilitam administrações por via oral a cada 12 horas tendo em conta a meia-vida das duas drogas. De maneira vantajosa, podem ser administrados por via intravenosa, particularmente no tratamento de doentes graves que não podem receber substâncias por via oral. Uma questão básica inicial é considerar a conveniência da troca de uma dupla de drogas por outra, e se com isso seria mantida a mesma eficácia terapêutica. Uma resposta definitiva deveria estar apoiada em estudo randômico comparativo em dois ramos. De todo modo, tem sido possível estimar os efeitos do tratamento pela equivalência de resultados, por exemplo, no tratamento da encefalite toxoplásmica em pacientes com Aids, que conta com uma investigação controlada e randomizada (Torre *et al.*, 1998) e, também, em casos de ativo comprometimento ocular (Soheilian *et al.*, 2005).

Posologia: 7-10 mg/kg/dia com base no trimetoprim, ou equivalentemente 35-50 mg/kg/dia em relação ao sulfametoxazol, tanto por via oral como por via intravenosa. Para adultos, dispõe-se de apresentação com 80 mg/400 mg, respectivamente, de trimetoprim e sulfametoxazol. Efeitos colaterais mais importantes incluem manifestações gastrintestinais, alergia cutânea e mielotoxicidade. O ácido folínico não precisa ser coadministrado preventivamente, como rotina.

CLINDAMICINA

A clindamicina é um antibiótico com documentada ação experimental contra *T. gondii* e com relativa boa experiência clínica em toxoplasmose humana. Nos casos mais graves, tem sido usada em combinação com a pirimetamina, quando então se admite uma eficácia comparável à dupla sulfadiazina com pirimetamina. Como opção alternativa, já possui considerável experiência no tratamento da toxoplasmose cerebral em pacientes com Aids. Possibilita administração por via oral e intravenosa, com distribuição para todos os tecidos, mas com baixa concentração liquórica.

Posologia: 10-40 mg/kg/dia, tanto por via oral quanto por via intravenosa, habitualmente não ultrapassando 2.400 mg para o adulto, administrada em partes iguais a cada seis a oito horas. Os efeitos colaterais mais significativos incluem manifestações gastrintestinais, com destaque para os quadros de colite por antibiótico, que podem ser graves; também podem ocorrer neutropenia, plaquetopenia e manifestações alérgicas cutâneas.

ESPIRAMICINA

Antibiótico macrolídio disponível para uso oral, a espiramicina apresenta grande afinidade tissular, e alcança concentrações nos tecidos várias vezes superior aos níveis plasmáticos. Essa característica farmacológica provê base para sua utilização em grávidas acometidas por infecção toxoplásmica aguda, e proporciona elevadas concentrações placentárias. Pode, assim, atuar como uma barreira na prevenção da transmissão vertical de *T. gondii*. Entretanto, sua concentração fetal é precária, de tal sorte que não propicia ação efetiva, caso já tenha ocorrido a infecção do concepto.

Posologia em adultos: 1 g por via oral a cada oito horas. Podem ocorrer manifestações de intolerância digestiva.

AZITROMICINA E CLARITROMICINA

A azitromicina e a claritromicina dispõem de limitada experiência clínica, embora sejam empregadas até em casos sérios como os de encefalite toxoplásmica, quando então têm sido usadas em combinação com a pirimetamina. Atuam na síntese proteica do apicoplasto de *T. gondii*.

Posologia da azitromicina para adultos: 500 mg/dia, até 1.000 mg/dia em casos mais graves. Tem elevada concentração intracelular, podendo merecer administrações diárias ou intervaladas a cada três dias. Posologia da claritromicina para adultos: 1 g a cada 12 horas. Manifestações de intolerância digestiva constituem o principal efeito colateral na administração oral destes antibióticos.

PRINCÍPIOS GERAIS DA TERAPIA FARMACOLÓGICA

Alguns princípios gerais regulam a terapia farmacológica com os medicamentos que estão dotados de ação contra o parasita, tendo em conta as comunicações selecionadas em livros e artigos de revisão, endossados por autores com experiência em toxoplasmose clínica (Frenkel & Bermudez, 2010; Gilbert & Williams, 2010; Heller, 2010a; Heller, 2010b; Levi & Mendonça, 2003; McLeod & Remington, 2004; Montoya & Liesenfeld, 2004; Montoya & Remington, 2008; Nee & Joiner, 2000; Petersen, 2007), além de representativos estudos controlados (Alavi & Alavi, 2010; Soheilian *et al.*, 2005; Torre *et al.*, 1998). A primeira consideração básica diz respeito ao tipo de paciente, se imunocompetentes ou, ao contrário, imunocomprometidos. Adicionalmente, se tais medicamentos estão sendo utilizados em caráter terapêutico ou profilático.

Indivíduos imunocompetentes (ver o capítulo 11) que adquirem infecção aguda por *T. gondii* frequentemente são assintomáticos ou oligossintomáticos, sendo o diagnóstico comumente despercebido. Quando adoecem, a forma mais comum é a toxoplasmose linfonodal, caracteristicamente um quadro clínico sem maior gravidade e de resolução habitualmente espontânea. No entanto, há casos de sintomatologia mais expressiva, seja pela intensidade e duração mais prolongada dos sintomas, seja pela participação de certos órgãos (nos casos, por exemplo, de pneumonite e miocardite). Nessas eventualidades, há consenso de que o tratamento específico deve ser realizado, com duração habitual de três a quatro semanas. As opções incluem o uso combinado de sulfadiazina com pirimetamina e também o emprego do cotrimoxazol; menos habitual é o emprego da clindamicina, com ou sem pirimetamina.

Uma situação que merece atenção especial é a infecção primária que acomete mulheres durante a gestação (ver o capítulo 10), quando a meta terapêutica for, mesmo em estado assintomático ou oligossintomático – que é mais comum –, a prevenção da transmissão vertical de *T. gondii* durante a fase de parasitemia e correspondente infecção placentária. A espiramicina tem merecido ampla preferência tanto na Europa quanto no Brasil; o uso da sulfadiazina com pirimetamina parece defensável após o primeiro trimestre gestacional, quando há documentação ou forte evidência de que tenha ocorrido transmissão intrauterina, na hipótese de se realizar o tratamento fetal.

Outra situação particular está relacionada com a coriorretinite toxoplásmica (ver o capítulo 14), alvo de múltiplas investigações sobre a efetividade do tratamento específico. Neste terreno, quase todos os medicamentos antes mencionados têm merecido utilização, sendo os mais considerados a sulfadiazina com pirimetamina, cotrimoxazol e clindamicina com ou sem pirimetamina.

Quanto aos pacientes imunocomprometidos (ver o capítulo 12), há na atualidade extensa fundamentação para o benefício inquestionável do tratamento específico. Os pacientes com Aids, em especial, têm sido tratados com a combinação de sulfadiazina e pirimetamina e, alternativamente, com a dupla clindamicina e pirimetamina. Há também apoio para o emprego do cotrimoxazol. Para as outras alternativas há bem menor experiência clínica.

A toxoplasmose congênita (ver os capítulos 10 e 13) pode ser entendida também como doença de pacientes relativamente imunocomprometidos e, tendo como preocupação potenciais e relevantes sequelas, os cuidados devem concentrar-se no emprego da combinação de sulfadiazina e pirimetamina, eventualmente intercaladas com a espiramicina, por período prolongado, até que se estabeleça uma apropriada maturidade imunológica do lactente.

No que se refere à profilaxia da toxoplasmose (ver o capítulo 12), destaque-se que é a conduta rotineira nos pacientes com Aids, considerado o emprego primário ou secundário, isto é, antes ou depois do aparecimento dos sinais e sintomas da doença. Enquanto persistir o risco de doença, na maioria das vezes por reativação, cabe a administração prolongada de medicamentos preventivos. O emprego do cotrimoxazol é imperativo na prevenção de pneumocistose, que se manifesta com maior frequência do que a neurotoxoplasmose, assim que o mesmo permanece como rotina de dupla finalidade. Na impossibilidade de empregar o cotrimoxazol, há várias alternativas que entram em cogitação. Alguma consideração também tem sido dedicada à profilaxia em casos de coriorretinite recorrente (ver o capítulo 14).

Finalmente, cabe considerar nesta revisão sumária sobre os princípios gerais do tratamento da toxoplasmose humana:

- há evidências sólidas do benefício do tratamento específico, já com a inclusão de alguns poucos estudos controlados;
- ainda assim, é possível levantar questionamentos sobre a demonstração cabal da efetividade do tratamento em diversas situações;
- coincidem opiniões de vários estudiosos da toxoplasmose humana no sentido de ainda serem necessárias investigações estruturadas na moderna visão da medicina baseada em evidências.

REFERÊNCIAS

ALAVI, S. M. & ALAVI, L. Treatment of toxoplasmic lymphadenitis with co-trimoxazole: double-blind, randomized clinical trial. *International Journal of Infectious Diseases*, 14, supl. 3: e67-e69, 2010. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20194044>. Acesso em: 06 set. 2010.

DEROUIN, F. *et al*. Experimental models of toxoplasmosis. Pharmacological applications. *Parasite*, 2: 243-256, 1995.

EYLES, D. E. & COLEMAN, N. Sinergistic effect of sulfadiazine and daraprim against experimental toxoplasmosis in the mouse. *Antibiotics and Chemotherapy*, 3: 483-490, 1953.

FRENKEL, J. K. & BERMUDEZ, J. E. V. Toxoplasmose. *In*: VERONESI, R. & FOCACCIA, R. (Eds.). *Tratado de Infectologia*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

GILBERT R & WILLIAMS K: Toxoplasmosis and pregnancy. Versão 18.2: mai. 2010. Disponível em: <www.uptodate.com online>. Acesso em: 06 set. 2010.

HELLER, H. M. Toxoplasmosis in HIV-infected patients. Versão 18.2: mai. 2010. Disponível em: <www.uptodate.com online>. Acesso em: 06 set. 2010.

HELLER, H. M. Toxoplasmosis in immunocompetent hosts. Versão 18.2: mai. 2010. Disponível em: <www.uptodate.com online>. Acesso em: 06 set. 2010.

JORDAN, M. K. *et al*. Plasma pharmacokinetics of sulfadiazine administered twice daily versus four times daily are similar in human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 635-637, 2004.

LEVI, G. C. & MENDONÇA, J. S. Toxoplasmose. *In*: CIMERMAN, S. & CIMERMAN, B. (Eds.). *Medicina Tropical*. São Paulo: Atheneu, 2003.

McLEOD, R. & REMINGTON, J. S. Toxoplasmosis. *In*: GORBACH, S. L.; BARTLETT, J. G. & BLACKLOW, N. R. (Eds.). *Infectious Diseases*. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.

MONTOYA, J. G. & LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. *The Lancet*, 363: 1.965-1.976, 2004.

MONTOYA, J. G. & REMINGTON, J. S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clinical Infectious Diseases*, 47: 554-566, 2008.

NEE, P. F. & JOINER, K. A. Toxoplasmosis. *Current Treatment Options in Infectious Diseases,* 2 (3): 249-258, 2000.

PETERSEN, E. Prevention and treatment of congenital toxoplasmosis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 5: 285-293, 2007.

SOHEILIAN, M. *et al*. Prospective randomized trial of trimethoprim/sulfamethoxazole versus pyrimethamine and sulfadiazine in the treatment of ocular toxoplasmosis. *Ophthalmology*, 112: 1.876-1.882, 2005.

TORRE, D. *et al*. Randomized trial of trimethoprim-sulfamethoxazole *versus* pyrimethamine-sulfadiazine for therapy of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. Italian Collaborative Study Group. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42: 1.346, 1998.

WEISS, L. M. & DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. *International Journal for Parasitology*, 39: 895-901, 2009.